

9678

h. a. i. m. van leusden



bilirubine
en geslachtssteroïden

BILIRUBINE EN GESLACHTSSTEROIDEN

PROMOTOR :
PROF. DR. L. A. M. STOLTE

BILIRUBINE EN GESLACHTSSTEROIDEN

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. H. J. LAMMERS,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE,
VOLGENS HET BESLUIT VAN DE SENAAAT
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP 3 MEI 1963
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR.**

DOOR

HUBERTUS ANTONIUS IDA MARIA VAN LEUSDEN

GEBOREN TE VUGHT

Centrale Drukkerij N.V. - Nijmegen

Aan Jacqueline

INHOUD

Inleiding

Hoofdstuk I.	De bilirubine stofwisseling van de ongeborene en de pasgeborene	1
	A. De bilirubine stofwisseling van de ongeborene	1
	B. De bilirubine stofwisseling van de pasgeborene	4
	C. De indeling van de geelzucht van de pasgeborene	5
Hoofdstuk II.	Experimenteel onderzoek over de bilirubine stofwisseling van de ongeboren Rhesusaap, bij in-stand gebleven zwangerschap	8
Hoofdstuk III.	De bilirubine stofwisseling van de Gunn rat . .	17
	A. De geelzucht van de Gunn rat	17
	B. Is de oorzaak van de neurologische stoornissen van de Gunn rat vergelijkbaar met de kern-icterus van de pasgeborene?	20
Hoofdstuk IV.	Het syndroom van de Gunn rat bij de mens . .	26
Hoofdstuk V.	De glucuronidering in het lichaam	28
	A. De glucuronidering van bilirubine	28
	B. De glucuronidering van andere stoffen dan bilirubine	30
Hoofdstuk VI.	De geslachtsrijping van de vrouwelijke Gunn rat	34
Hoofdstuk VII.	De invloed van de oplosmiddelen van bepaalde geslachtssteroïden op de serumbilirubineconcentratie van de Gunn rat	43
Hoofdstuk VIII.	De invloed van de natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden op de leverfunctie van de Gunn rat	54
	A. <i>In vitro</i> onderzoeken	55
	1. De eigenschappen van het gedeeltelijk gezuiverd glucuronyltransferase	55
	2. De remming van de glucuronidering van het p-nitrophenol door natuurlijke en	

kunstmatige geslachtssteroïden	58
3. De remming van de glucuronidering van bilirubine door pregnandiol	61
4. De aard van het tekort aan glucuronyl- transferase van de Gunn rat	61
B. <i>In vivo</i> onderzoeken	63
C. Conclusies	70
Hoofdstuk IX. Bespreking	72
Samenvatting	74
Summary	77
Literatuur	80

INLEIDING

In 1957 deelden LATHE en WALKER mee, dat in homogenaten van levers van pasgeborenen het vermogen tot glucuronidering van bilirubine ontbrak. Zij konden (LATHE en WALKER, 1958a) in schijven en homogenaten van de levers van kinderen, die 26, 32 en 25 foetale weken oud waren, op respectievelijk de vierde, eerste en eerste levensdag geen glucuronidering van bilirubine en o-aminophenol vinden. DUTTON (1958) toonde aan, dat in homogenaten van levers van drie en vier intrauteriene maanden oude menselijke foetus de o-aminophenolglucuronidering ontbrak.

Door dit vastgestelde aangeboren tekort aan glucuronyltransferase acht men thans de vaak voorkomende hyperbilirubinaemie in de eerste levensdagen van de mens grotendeels verklaard.

In dit proefschrift is het mogelijke glucuronyltransferase tekort in de levers van een aantal pasgeborenen *in vitro* onderzocht met onveranderd p-nitrophenol als aglycon. Dezelfde onderzoeken werden verricht bij de zogenaamde Gunn rat. Deze rat heeft, zoals bekend, erfelijk een blijvend tekort aan bilirubineglucuronyltransferase in de lever*). Het bleek nu, dat de levermicrosomen van de Gunn rat het p-nitrophenol even goed konden glucuronideren als die van de normale Wistar rat. Hierdoor rees de vraag, of er één of meer dan een glucuronyltransferase bestaat. Dit probleem is aan de hand van literatuurgegevens en eigen waarnemingen benaderd.

Aangezien de mens *bij de geboorte* geen geelzucht heeft — deze treedt pas later op — werd een eventuele glucuronidering van het bilirubine door de, met de menselijke placenta vrijwel geheel vergelijkbare, haemochoriale placenta van de Rhesusaap onderzocht. Voor dit doel werd de foetus van de Rhesusaap bij instand blijvende zwangerschap *in vivo* met bilirubine belast.

Bij een poging het ontbreken van de glucuronidering van het bilirubine in de lever van de ongeborene door een remming te verklaren, vonden LATHE en WALKER (1958b), dat de glucuronidering van het bilirubine in schijven rattenlever zowel door sera van zwangeren als door progesteron en enkele van zijn derivaten werd geremd. Opmerkelijk

*) Deze rattenstam werd ons in 1958 toegezonden door wijlen Dr. W. E. CASTLE, Dept. of Genetics, University of California, Berkeley 4, California, U.S.A., waarvoor wij bijzonder erkentelijk zijn. Het telen kon geschieden in het Centraal Dierenlaboratorium (Directeur Dr. M. J. Dobbelaar; bedrijfsleider E. van Galen), dank zij de verzorging door de heren S. BOURS en L. KARTHAUS.

was evenwel, dat de glucuronidering van het bilirubine en het o-aminophenol in homogenaten van rattenlevers niet door progesteron en derivaten werd geremd. Niet in overeenstemming met deze bevindingen waren de proeven van HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMAN (1960), die door zuivering van sera van zwangeren bewezen, dat pregnandiol-3 α , 20 α en zeer waarschijnlijk ook allopregnantriol en pregnanolon de oorzaak konden zijn van de remming van de glucuronidering in homogenaten van rattenlevers. De behoefte werd gevoeld de tegenstrijdigheden uit de onderzoeken over de onderlinge beïnvloeding van de glucuronidering van het bilirubine door de steroïden te onderwerpen aan een nader onderzoek.

Het mogelijke verband tussen de stofwisseling van het bilirubine en de steroïden werd (*in vivo*) verder onderzocht bij de Gunn rat. Dit onderzoek bestond enerzijds in het nagaan of er bij dit dier wellicht bijzonderheden of afwijkingen bestonden in de geslachtelijke verschijnselen, welke immers onder overwegende invloed van de geslachtssteroïden staan. Anderzijds werd een onderzoek verricht over de invloed die toegediende natuurlijke en kunstmatige steroïden op de bilirubine stofwisseling van Gunn ratten hebben. Bij dit laatste onderzoek stootten wij op het vraagstuk van de invloed van de oplosmiddelen van diverse steroïden op de bilirubine stofwisseling.

De beschrijving van de uitkomsten van onze onderzoeken wordt voorafgegaan door een voor het begrijpen van het behandelde noodzakelijk literatuur overzicht over de bilirubine stofwisseling van de ongeborene en van de pasgeborene en die van de Gunn rat. De vraag wordt beantwoord — daarbij steunend op eigen waarnemingen — of de mening van JOHNSON, SARMIENTO, BLANC en DAY (1959), dat de oorzaak van de neurologische stoornissen van de Gunn rat identiek zou zijn met de kernicterus van de pasgeborene, zonder meer aanvaard moet worden.

HOOFDSTUK I

DE BILIRUBINE STOFWISSELING VAN DE ONGEBORENE EN DE PASGEBORENE

De geelzucht van de pasgeborene is een, vooral bij vroeggeborenen, vaak voorkomend verschijnsel, dat niet zelden snel verdwijnt, maar soms langdurig is. De sterke stijging van het indirecte bilirubinegehalte van het serum, die er de oorzaak van is, kan tot de dood voeren, of ernstige restverschijnselen achterlaten in de vorm van een hersenbeschadiging die „kernicterus” genoemd wordt. Het is gebleken, dat deze hyperbilirubinaemie ontstaat omdat de lever bij de geboorte niet in staat is het vetoplosbare bilirubine door glucuronidering wateroplosbaar en als zodanig door uitscheiding onschadelijk te maken. Dit bilirubineglucuronide geeft een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH. Het wordt direct bilirubine genoemd. Wanneer de serumbilirubineconcentratie toeneemt kan het vetoplosbare pigment door de zenuwcellen worden opgenomen. De zenuwcellen kunnen hierdoor worden beschadigd.

Volgens ZUELZER en BROWN (1961) treedt geelzucht op bij ongeveer een derde van alle pasgeborenen, en bij meer dan de helft van alle vroeggeborenen. VAN KESSEL en ZONDERLAND (1961) stelden een onderzoek in naar het verloop van icterus en bilirubineconcentratie bij 1087 in onze kliniek levend geboren zonder Rhesusantagonisme.

Bij de mature kinderen zag men in 8% der gevallen aanleiding tot het bepalen van het bilirubine. In het totaal werd bij 131 kinderen het serumbilirubinegehalte onderzocht. Zij vonden, dat bij normale mature pasgeborenen van normale moeders de kans dat de bilirubineconcentratie van het plasma stijgt tot 20 mg.% uitermate gering was, zo niet te verwaarlozen. Bij ABO-incompatibiliteit bleek de kans op hoge bilirubineconcentratie (10–20 mg.%) verhoogd.

Vroeggeboorte voerde gemakkelijk tot indicatie voor exsanguinatie, met name indien de bilirubineconcentratie sneller steeg dan met 3,5 mg.% per dag.

A. De bilirubine stofwisseling van de ongeborene

Zowel tijdens het intrauteriene leven, als kort daarna blijkt de lever van de menselijke foetus evenals van de foetus van verschillende dieren geen glucuronyltransferase te bevatten (tabel 1).

Het onderzoek naar de aanwezigheid van glucuronyltransferase in de placenta is minder uitgebreid geweest. De uitslag was altijd negatief. (tabel 2)

Het bilirubinegehalte van de vrucht blijft bij de mens binnen bepaalde grenzen. Bekend is, dat de serumbilirubineconcentratie van de

Lever

Tabel 1

	pasgeboren muizen	konijnenfoetus	cavia foetus	rattenfoetus; pasgeboren ratten	mensenfoetus
methode	schijven	schijven	suspensies; microsomen	homogenaten	suspensies en schijven
aglycon	o-aminophenol; p-nitrophenol	o-aminophenol	phenolphthaleïne; bilirubine	bilirubine	o-aminophenol; bilirubine
auteurs	KARUNAIRATNAM, KERR en LEVY (1949), VAN LEUSDEN, BAKKEREN, ZILLIKEN en STOLTE (1962)	HARTIALA en PULKKINEN (1955)	BROWN, ZUELZER en BURNETT*) (1958); TJON SIEN KIE*) (1961)	GRODSKY, CARBONE en FRANSKA, (1958)	DUTTON (1958); LATHE en WALKER (1958a).

Het tekort aan glucuronyltransferase in de foetale lever van de mens en van de verschillende dieren.

*) deze onderzoekers vonden ook een tekort aan UDPG-dehydrogenase.

Het tekort aan glucuronyltransferase in de placenta van de mens en van verschillende diersoorten.

	konijnen	mensen en ratten
methode	schijven	schijven en suspensies
aglycon	o-aminophenol	o-aminophenol; bilirubine; p-nitrophenol
auteurs	HARTIALA en PULKKINEN (1955)	LEVY en STOREY (1949) HARTIALA en PULKKINEN (1955) STROMINGER, MAXWELL, AXELROD en KALCKAR (1957); SCHMID, HAMMAKER en AXELROD (1957);

foetus meestal 1 of meer mg.% hoger is dan van de moeder (GOLDBLOOM en GOTTLIEB, 1929; FINDLAY, HIGGINS en STANIER, 1947; HSIA, ALLEN, DIAMOND en GELLIS, 1953). Het bilirubine in het navelstrengbloed is ongeconjugueerd (zie SMITH, 1959). Kinderen met erythroblastosis foetalis zijn bij de geboorte niet icterisch, maar na de geboorte treedt snel geelzucht op.

Het bilirubine van de vrucht in utero kan theoretisch op vier manieren worden gereguleerd:

1. de foetale lever glucuronideert het bilirubine, zodat het kan worden uitgescheiden.
2. andere foetale organen glucuronideren het bilirubine. [DUTTON (1958) vond, dat de maag van de caviafoetus in geringe mate o-aminophenol kan glucuronideren. STEVENSON en DUTTON (1962) vonden geringe glucuronidering van o-aminophenol in de nieren van de caviafoetus].
3. de placenta glucuronideert het bilirubine.
4. de moederlijke lever glucuronideert het door de foetus aangeboden bilirubine.

De sterke stijging van de bij de geboorte licht verhoogde serumbilirubineconcentratie tot een veel sterker indirecte bilirubinaemie na de geboorte zou kunnen wijzen in de richting van een belangrijke rol van de placenta.

Wij hebben daarom (Hoofdstuk II) een experimenteel onderzoek verricht naar de rol van de placenta in de bilirubine stofwisseling van de ongeborene bij intact gebleven zwangerschap van de Rhesusaap. Deze placenta is verregaand vergelijkbaar met die van de mens.

Het is gebleken, dat er geen eenvoudige diffusie is bij de overgang van het bilirubine *van de moeder naar het kind*.

SMITH (1959) vond bij een moeder met obstructieicterus bij de geboorte van het kind de navolgende getallen:

	moederlijk bloed	navelstrengbloed
direct bilirubine	20,8 mg.%	0,13 mg.%
indirect bilirubine	2,9 mg.%	1,2 mg.%
totaal	23,7 mg.%	1,33 mg.%

WATERS (1959) (zie SCHMID, BUCKINGHAM, HAMMAKER en MENDENILLA, 1959b) vond de volgende getallen:

	moederlijk bloed	navelstrengbloed
direct bilirubine	8,4 mg.%	0,75 mg.%
indirect bilirubine	2,2 mg.%	1,55 mg.%

Zowel het direct als indirect serumbilirubine is in deze gevallen in het serum van de moeder hoger dan bij de vrucht. Het geconjugeerde bilirubine gaat zeer waarschijnlijk niet van de moeder naar het kind over.

B. De bilirubine stofwisseling van de pasgeborene

De geelzucht, welke ongeveer bij een derde van de pasgeborenen voorkomt, treedt meestal op van de derde tot de zesde levensdag. Hyperbilirubinaemie komt waarschijnlijk bij alle pasgeborenen voor (zie SMITH, 1959). Hoe hoger de bilirubineconcentratie van het navelstrengbloed is, des te sterker zal de serumbilirubineconcentratie stijgen (o.a. KLOOSTERMAN, 1947; SEELEN, 1956; zie ook SMITH, 1959).

Een moeilijkheid bij de beoordeling van de mate van de geelzucht is de omstandigheid, dat de methodes om het serumbilirubine te meten niet volledig betrouwbaar zijn (o.a. LATHE en RUTHVEN, 1958; MICHAELSSON, 1961). Bovendien zijn in de verschil-

lende laboratoria verschillende modificaties van de bilirubinebepaling in gebruik. De uitkomsten van de verschillende onderzoekers stemmen als gevolg hiervan niet altijd overeen. Deze omstandigheden verklaren, waarom de verschillende onderzoekers niet dezelfde maat gebruiken voor het instellen van een therapie in de vorm van een wisseltransfusie (o.a. CROSSE, MEYER en GERRARD, 1955; PALMER en REQUIEM, 1957; MORES, FARGASOVA en MINERAJKOVA, 1959; LUCEY, 1960; JABLONSKI, 1962). De meeste auteurs beschouwen een serumbilirubineconcentratie van 20-25 mg.% als een indicatie voor wisseltransfusie. Zij wisselen bij vroeggeborenen liefst onder de 20 mg.%. De wisseltransfusie wordt gegeven om kernicterus te voorkomen.

C. De indeling van de geelzucht van de pasgeborene

Het tekort aan glucuronyltransferase in utero heeft geen enkele praktische consequentie zolang er geen bilirubine wordt aangeboden. De zwangerschap van de mens duurt, in tegenstelling tot hetgeen bij verscheidene dieren het geval is, enige malen langer dan het leven van zijn erythrocyten. Daarom zal tijdens het intrauteriene leven van de mens zeker bilirubine worden gevormd.

ZUELZER en BROWN (1961) hebben er op gewezen, dat een geringe stijging van de haemoglobine afbraak de hyperbilirubinaemie in de eerste levensdagen relatief sterk kan doen toenemen: de dagelijkse belasting van de lever van een normale pasgeborene van 3 kg met een bloedvolume van 300 ml. en een totaal haemoglobine van 54 gram (Hb 18 gr.%) bedraagt 0,5 gr. Hb per dag, indien 1% haemolyse optreedt. Dit betekent, dat 17 mg. bilirubine wordt aangeboden. ZUELZER en BROWN (1961) gaan nu van de veronderstelling uit, dat deze 17 mg. die per dag wordt aangeboden de grens is van het uitscheidend vermogen van de lever van de pasgeborene: bij nagenoeg alle pasgeborenen komt immers hyperbilirubinaemie voor. Indien de haemolyse met 1% toeneemt, is het gevolg, dat de totale hoeveelheid haemoglobine in plaats van 0,5 gram 1 gram per dag afneemt, hetgeen zal inhouden, dat de haemoglobineconcentratie 17,7 gr.% wordt, i.p.v. 18 gr.%. Dit is een verschil, dat met de gebruikelijke methodiek niet aan te tonen is. Tevens zal deze geringe verhoging van de haemolyse ten gevolge hebben, dat in plaats van 17 mg., 34 mg. bilirubine per dag aan de lever van de pasgeborene wordt aangeboden. Dit betekent, dat de plasma-bilirubineconcentratie met meer dan 10 mg.% wordt verhoogd (aangenomen, dat zich alle pigmenten in het plasma bevinden).

Men neemt aan, dat de bloedafbraak bij de normale pasgeborenen in het algemeen niet zeer sterk verschilt van de bloedafbraak bij volwassenen. (MOLLISON, 1948; MOLLISON en CUTBUSH, 1951; KAPLAN, 1959, 1961). Sommige onderzoekers vonden een verkorte levensduur van de erythrocyten van de vroeggeborene. (zie o.a. KAPLAN, 1961).

In de tabellen 3, 4 en 5 zijn aan de hand van een aantal endogene en exogene factoren, welke de serumbilirubineconcentratie van de pasgeborene al dan niet pathologisch kunnen beïnvloeden, de oorzaken van geelzucht van de pasgeborene gegroepeerd.

5 Tabel 3. De hyperbilirubinaemie van de pasgeborene. Bevorderende factoren: (uitgezonderd de invloed van geneesmiddelen).

Vergrote aanmaak van bilirubine		Verminderde uitscheiding van bilirubine	
A. Vergrote aanmaak van bilirubine gepaard gaande met verkorte levensduur van de erythrocyten.	B. Vergrote aanmaak van bilirubine zonder verkorting van de levensduur van de erythrocyten.	A. Aandoeningen, bij welke de glucuronidering is verminderd.	B Stoornissen na de glucuronidering in de lever
1) icterus gravis (LEVINE, KATZIN en BURNHAM, 1941); (D (90%), C.S. en Kell antigenen). 2) icterus praecox (HALBRECHT, 1944): ABO-incompatibiliteit (zie ook SEELLEN, 1955, 1957; SCHELLEKENS, SEELEN en BAKKER, 1958). 3) congenitale haemolytische icterus a) sferocytair (CONRAD en SCHMIDT, 1946); b) nonsferocytair (BRUTON, CROSBY en MOTULSKY, 1954). 4) glucose-6-fosfaatdehydrogenase tekort (DOXIADIS, FESSAS en VALAES, 1961; MOTULSKY, 1961). 5) cephaalhaematoom e.a. haematomen. 6) vroeggeboorte (?).	1) laat afnavelen, (RENAER, 1945; KLOOSTERMAN, 1947; VAN KESSEL en ZONDERLAND, 1961). 2) mogelijk cephaalhaematoom e.a. haematomen.	a. bewezen 1. syndroom van Crigler Najjar (zie verder) 2. bepaalde vormen van de ziekte van Gilbert-Léreboullet. (ARIAS, 1959a). 3. vroeggeboorte (LATHE en WALKER, 1957, 1958; DUTTON, 1958).	b. waarschijnlijk: 1. lues (FINKELSTEIN, 1938). 2. toxoplasmose (SABIN, 1942). 3. neonatale hepatitis (STOKES, WOLMAN, BLANCHARD en FARQUHAR, 1951). 4. cytomegalia infantum (WYATT, SAXON, LEE en PINKERTON, 1950). 5. galactosaemie (KALCKAR, ANDERSON en ISSELBACHER, 1956; ZUELZER en BROWN, 1961). 6. „cretinisme“ (AKKEREN, 1954). 7. diabetes (ZUELZER en BROWN, 1961). 8. sepsis (BERNSTEIN en BROWN, 1960).
indirecte hyperbilirubinaemie		directe hyperbilirubinaemie.	

Tabel 4. Geneesmiddelen, welke het serumbilirubinegehalte van de pasgeborene doen stijgen.

<i>Vergrote aanmaak van bilirubine</i>	<i>Verminderde uitscheiding van bilirubine</i>	
1. hoge doses wateroplosbaar vitamine K (ALLISON, 1955) 2. Resorcine (CUNNINGHAM, 1956) 3. naphthaleen (COCK, 1957)	Remming van de glucuronidering	Remming van de uitscheiding van bilirubineglucuronide.
	1. bepaalde vitamine K-paeparaten. (SOLVONUK, JAQUES, LEDDY, TREVOY en SPINKS, 1952; WATERS, DUNHAM en BOWEN, 1958) 2. novobiocine (HARGREAVES en HOLTON, 1962) 3. bepaalde steroïden (zie verder)	1. bepaalde steroïden ARIAS, 1962.

Tabel 5. Geneesmiddelen, welke het serumbilirubinegehalte van de pasgeborene verlagen door verdringing van het bilirubine uit de binding met het albumine.

<div> <div> 1. sulfa-paeparaten 2. Na-salicylaat 3. caffeïne-Na-benzoaat </div> <div> <div> 4. benzylalcohol en verwante stoffen </div> </div> </div>	<div> <div> </div> <div> </div> </div>
	<div> <div> </div> <div> </div> </div>

EXPERIMENTEEL ONDERZOEK OVER DE
BILIRUBINE STOFWISSELING VAN DE
ONGEBOREN RHESUSAAP, BIJ INSTAND
GEBLEVEN ZWANGERSCHAP

Eigen onderzoek:

Wij konden de glucuronyltransferasedeficiëntie in de levers van de foetus van mens, aap en „Swiss mice” voor wat betreft de glucuronidering van het p-nitrophenol bevestigen: Tabel 6.

De vraag rijst op welke wijze de vrucht er in slaagt het door hem gemaakte bilirubine te klaren. Het in het foetale serum aanwezig bilirubine kan, door de placenta, naar het moederlijk bloed gaan, na al dan niet geglucuronideerd te zijn, hetzij door de foetale lever, hetzij door de placenta.

Er is nog een ruimte waarheen het foetale bilirubine zou kunnen uitwijken en dat is het vruchtwater. Het is bekend, dat bij een verhoogde intrauteriene bloedafbraak, zoals bij het Rhesusantagonisme plaats vindt, het vruchtwater door de er in toenemende bilirubineconcentratie icterisch wordt. Aan het onderzoek van dit vruchtwater (SEELEN, 1961) kan worden beoordeeld of de foetus Rhesus positief is en of er reeds een indicatie is om een partus arte praematurus te doen.

Eigen waarneming:

De overgang van bij de moeder ingespoten bilirubine naar het vruchtwater konden wij volgen bij een zwangere, aan wie uit anderen hoofde 50 mg. bilirubine i.v. werd toegediend. Het betrof een primigravida, die 25 weken zwanger was. Wij vonden de volgende gegevens (Tabel 7).

Bij het doormeten van het absorptiespectrum van het vruchtwater bleek de top bij 460 m μ te liggen, hetgeen suggereert, dat het bilirubine in het vruchtwater als bilirubine-albumine complex aanwezig is.

Onze conclusie is, dat waarschijnlijk bilirubine van de moeder naar het vruchtwater kan overgaan. Met de door ons gebruikte methodiek voor de bepaling van het bilirubine (MALLOY en EVELYN, 1937) is bij de gevonden concentraties niet met zekerheid uit te maken of het bilirubine in het vruchtwater al dan niet geglucuronideerd was.

SCHMID, BUCKINGHAM, MENDENILLA en HAMMAKER (1959a) vonden bij caviae, dat een oplossing van kristallijn bilirubine, ingespoten in de moederlijke circulatie, snel in het

	De vorming van p-nitrophenol glucuronide in μ mol. per mg. N per 30'						
	graviditeits- duur	levensduur na de geboorte	geboorte- gewicht	lengte	obductie	15.000 x g. supernatant	105.000 x g. microsomen
„Swiss mice”		1½ dag				0,000	
Rhesusaap	± 4½ maand	1½ uur		46 cm	gb.	0,010	
mens, ♂	40 weken	2 uur vóór de geboorte † (sol. placentae)	2950 gram	33 cm	gb.	0,000	
mens, ♀	26 weken	2½ uur	750 gram	31 cm	gb.	0,000	
mens, ♂	26½ week	1½ uur	810 gram		gb.	0,000	0,000

Incubatie-systeem: 0,15 μ mol. p-nitrophenol; 0,06 μ mol. UDPGA; 26 μ mol Trisbuffer, pH 7,4; 1 μ mol. 1,4-saccharolacton*); 0,03 ml. microsomen of supernatant suspensie (totaal volume 0,305 ml.). Incubatietemperatuur: 37° C. De reactie werd gestopt door het toevoegen van ethanol. Een bepaalde hoeveelheid werd aan 10 N KOH toegevoegd en bij $\lambda = 400$ m μ gemeten. Alle cijfers zijn bepalingen in duplo. De hoeveelheid eiwit in de suspensie werd bepaald volgens LOWRY, ROSEBROUGH, FARR en RANDALL (1951).

∞ Voor verdere bijzonderheden van de bepaling: zie Hoofdstuk VIII.

*) Het 1,4-saccharolacton werd toegevoegd om het β -glucuronidase te remmen.

Tabel 7. 25 weken I-gravida.
Op 0' : 50 mg. bilirubine i.v.

Tijd	serumbilirubineconcentratie van de moeder		totale concentratie bilirubine in het vruchtwater
	direct	totaal	totaal
0'	0,1 mg. %	0,3 mg. %	0,05 mg. %
5'	0,3 mg. %	0,9 mg. %	0,11 mg. %
15'	0,2 mg. %	0,8 mg. %	0,12 mg. %
25'	0,2 mg. %	0,6 mg. %	0,05 mg. %

bloed van de foetus verscheen. JOHNSON, GARCIA, FIGUEROA, SARMIFNTO en DAY (1961) vonden bij ratten hetzelfde, hoewel de uiteindelijk bereikte bilirubineconcentratie van de foetus veel lager lag dan bij de moeder. Zij verklaren deze lage concentratie bij de foetus uit de bilirubinebindingscapaciteit van het moederlijke serumewit, welke aanzienlijk groter is dan die van de foetus.

Een experimenteel onderzoek betreffende de overgang van bilirubine van de foetus naar de moeder, werd door SCHMID, BUCKINGHAM, MENDENILLA en HAMMAKER (1959a) bij caviae verricht. De foetus werden via een insnijding uit de uterus gelicht en in een physiologische zoutoplossing bij 37° geboren. De placenta bleef aan de uteruswand verbonden. In de a.umbilicalis werd aan menselijk albumine gekoppeld bilirubine gespoten. Het werd ongeconjugeerd in de uterusvene teruggevonden. Het bilirubine was opgelost in met J¹³¹ gemerkt albumine. Dit albumine ging door de placenta heen. In welke mate wordt niet vermeld.

Deze doorgang voor J¹³¹ albumine kan een eigenaardigheid van de caviaplacenta zijn. De placenta van de Rhesus aap bleek in onze experimenten (zie verder) niet of nauwelijks voor humaan albumine doorgankelijk. Uit het verslag van de proeven van SCHMID e.m. (1959a) kan niet worden opgemaakt of de door hen gevonden doorgankelijkheid niet een gevolg zou kunnen zijn geweest van een contaminatie met niet aan albumine gebonden J¹³¹. Wijzelf vonden n.l., dat ongeveer 1% van het J¹³¹ in de ingespoten oplossing niet aan het albumine was gebonden (zie verder). Dit niet aan het albumine gebonden J¹³¹ zou een verklaring kunnen geven voor de door SCHMID e.m. (1959a) beschreven doorgang van het albumine door de placenta van de cavia.

Spoten SCHMID e.m. (1959a) bilirubineglucuronide in de a.umbilicalis van de caviafoetus, dan was de doorgang van geconjugeerd bilirubine door de placenta van de cavia zeer gering.

Uit de beschreven in vitro en in vivo experimenten kan men het vermoeden uitspreken, dat het bilirubine als zodanig door de placenta *van de foetus naar de moeder* overgaat. Het bewijs voor deze doorgang is nog niet geleverd voor een placenta, welke kan worden vergeleken met die van de mens. Hoewel de caviaplacenta, evenals die van de mens, een

haemochoriale is, is zij daarmee zeker niet identiek.

„The findings in the labyrinth of the rodent's placenta, as well as in that of the rabbit's, are very different from those found in human placental villi where the trophoblast, which constitutes the principal component of the placental membrane, consists of an inner cellular layer (the Langhans' cells) adjacent to the foetal stroma, and an outer syncytial layer (the syncytium) which is bathed by the circulating maternal blood in the intervillous space” (AMOROSO, 1961).

Een oplossing voor deze moeilijkheid trachtten TROEN en GORDON (1958) en PAGE (1960) te vinden door doorstromingsproeven van menselijke placentae. Hierbij bleek, dat bilirubine als zodanig van de vrucht naar de moeder lijkt te gaan, zonder dat dit orgaan het bilirubine koppelde aan glucuronzuur. Tegen deze proeven bracht MC. CANCE (1960) in, dat de omstandigheden, waaronder de experimenten gedaan waren „were probably far from physiological”.

Deze fysiologische omstandigheden meenden wij te kunnen vinden bij die zwangere apen, die een met die van de mens verregaand vergelijkbare haemochoriale placenta hebben, en bij wie het mogelijk is door middel van de techniek van REYNOLDS, PAUL en HUGGETT (1954) bilirubine in de foetale circulatie in te spuiten. De zwangerschap blijft dan volledig intact.

Deze techniek berust op het feit, dat de apenfoetus twee placentae heeft: de navelstreng gaat uit van de ene placenta, de andere placenta ontvangt twee tot vier takken van de navelstrengvaten, welke takken zich tussen het amnion en het chorion bevinden. Men kan nu, zonder het amnion te kwetsen, zulk een vat opzoeken en katheteriseren. Deze techniek werd door ons toegepast bij vergevorderde zwangerschappen van MACACUS MULATTA en CERCOPITHECUS AETHIOPS, die onder pentothal-fluothaan anaesthesie gebracht waren.*)

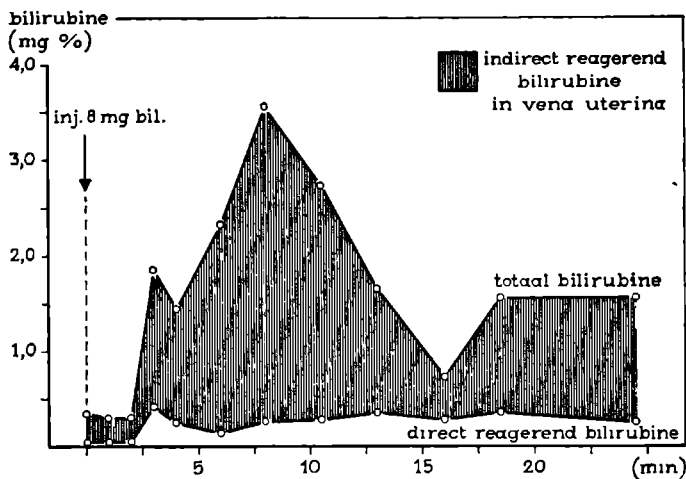
In de circulatie van de foetus werd 5—8 mg. bilirubine gespoten. Uit een uterusvene werden bloedmonsters van 3 ml. afgenomen, waarin onmiddellijk het directe en totale bilirubinegehalte volgens de methode van MALLOY en EVELYN werd bepaald. (Fig. 1 en 2).

Teneinde er zeker van te zijn, dat er geen kunstmatig lek in de placenta was ontstaan, werden de erythrocyten van de foetus gemerkt met Cr ⁵¹.

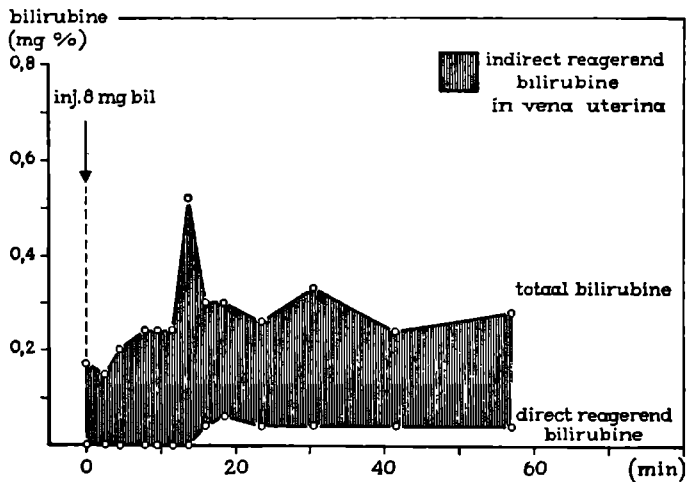
Bij 2 apenfoetus ging het ingespoten bilirubine als zodanig over, in tegenstelling tot de met Cr ⁵¹ gemerkte erythrocyten, die niet meetbaar naar de moeder overgingen.

*) Voor de medewerking van de biotechnicus Th. Arts willen wij onze erkentelijkheid betuigen.

De anaesthesie werd gegeven door assistenten van de afdeling Anaesthesiologie (Hoofd Dr. J. F. Crul), waarvoor wij onze dank betuigen.



Figuur 1: De overgang van het in de foetale circulatie gespoten bilirubine naar de moeder geschiedt nagenoeg geheel als indirect reagerend bilirubine (*Cercopithecus Aethiops*). Wij vestigen er de aandacht op, dat de schaal van deze figuur verschilt van die van de volgende.



Figuur 2: De overgang van het in de foetale circulatie gespoten bilirubine, geschiedt geheel als indirect reagerend bilirubine. (*Macacus Mulatta*).

Bij papirelectrophorese van de bij het experiment van figuur 1 in gespoten albumine-J¹³¹ oplossing, bleek, dat ongeveer 1% van de activiteit van het J¹³¹ niet aan het albumine was gebonden. Dit niet aan het albumine gebonden J¹³¹ zou van de foetus naar de moeder kunnen zijn overgegaan.

Het aantal cpm./ml. in het foetale vat bedraagt ongeveer 200.000, het aantal cpm./ml. in de uterusvene is ongeveer 200 (Tabel 8). Neemt men nu aan, dat de ongeveer 1% niet aan het albumine gebonden J¹³¹ van de foetus naar de moeder is overgegaan, en dat deze 1% in de moederlijke circulatie ongeveer tienmaal is verdund, dan wil dit zeggen, dat het aantal cpm./ml. in de uterusvene redelijk met de verwachting overeenstemt.

Tabel 8. J¹³¹ activiteit in uterusvene en placenta vat na injectie van 15 μ C J¹³¹ albumine (humaan) in foetaal vat, gemeten bij experiment van figuur 1.

Min. na injectie	cpm/ml. uterusvene	cpm/ml. foetaal vat
0	10	
2'30"	130	
4'30"	170	
7'48"	130	
9'30"	140	750
10'36"		214.500
11'30"	100	
12'30"		198.000
13'42"	80	
16'00"	140	
18'30"	160	
23'30"	150	
30'30"	230	
34'00"		226.700
41'30"	280	
51'30"		155.300
54'18"		155.450
56'00"		181.500
57'00"	140	

In onze experimenten werd het bilirubine als een waterige oplossing van de kristallijne stof ingespoten. Tegen het hiermede verkregen resultaat zou men kunnen opwerpen, dat bij het aanbieden van het niet aan albumine gebonden bilirubine aan de foetus, de overgang door de placenta zou plaats gevonden hebben vóór al het ingespoten bilirubine aan het albumine van de foetus gebonden was.

Teneinde deze moeilijkheid te omzeilen werd kristallijn bilirubine eerst aan met J¹³¹ gemerkt humaan albumine gebonden om daarna in

de stroomrichting van een placentavene gespoten te worden. Bij onderzoek van de postpartum verkregen placenta bleek deze vene rechtstreeks naar de navelstreng te lopen (resultaat, zie figuur 3).

De top van het absorptiespectrum van de oplossing bevond zich bij 460 m μ . Aan gezien er geen top bij 420 m μ aanwezig was, was al het bilirubine aan het albumine gebonden. De samenstelling van de oplossing was als volgt:

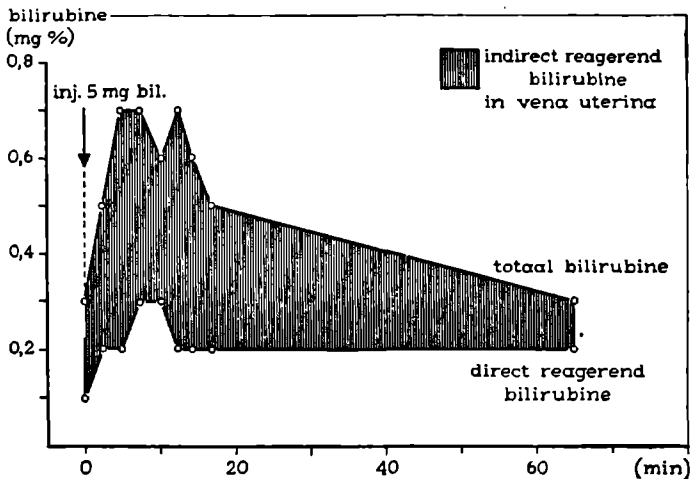
20 μ C. J ¹³¹ -albumine	0,1 ml.
bilirubine 150 mg.%	0,6 ml.
20% albumine	4,0 ml.

Totale volume: 4,7 ml.

Van deze oplossing werd ingespoten: 3 ml.

Bij papirelectrophorese van deze oplossing bleek, dat ongeveer 1% van het J¹³¹ in de oplossing niet aan het albumine was gekoppeld.

Vóór en na het experiment waren de foetale harttonen aanwezig.



Figuur 3: De overgang van het in de foetale circulatie aan albumine gebonden ingespoten bilirubine geschiedt nagenoeg geheel als indirect bilirubine. (Macacus Mulatta).

6 uur na de ingreep, was de top van het absorptiespectrum van het vruchtwater 460 m μ . Het totale bilirubinegehalte was < 0,1 mg. %.

Er was slechts een geringe overgang naar de moeder van het ingespoten J¹³¹-albumine (Tabel 9).

Op een overeenkomstige wijze als opgemerkt bij Tabel 8 kan men de veronderstelling toetsen, dat de 1% niet aan het albumine gebonden J¹³¹ van de foetus naar de moeder overgaat. Het verwachte aantal cpm./

Tabel 9

J^{131} in uterusvene na injectie van 15μ C J^{131} albumine in de foetale circulatie, gemeten bij het experiment van figuur 3.			
Tijd na de injectie	cpm/ml.		
2' 22"	360		
4' 45"	460		
7' 22"	360		
10' 7"	230	navelstrengbloed:	cpm/ml. (6 uur na de ingreep) 232.154
12' 21"	330		
14' 14"	300		
16' 55"	210		
65' 0"	90		

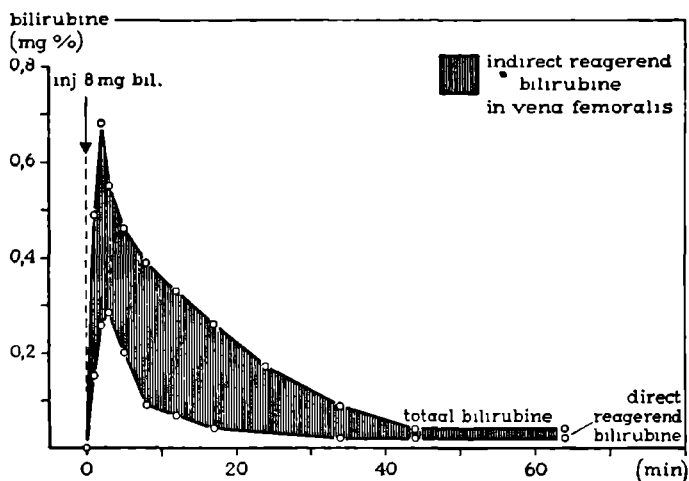
ml. in de uterusvene zou dan, uitgaande van de waarde in het navelstrengbloed 6 uur na de ingreep, 230 zijn. In dit experiment mag men een geringe overgang van het albumine J^{131} dus niet uitsluiten.

In figuur 1 en 3 is er een geringe stijging te zien van het met onze methodiek bepaalde direct reagerende bilirubine, die in de uterusvene enige minuten na de injectie optreedt. Uit de figuur 2 blijkt dat in het geheel geen stijging van het direct bilirubine opgetreden is. Deze „stijging” van het directe bilirubine in de figuren 1 en 3 wordt zeer waarschijnlijk verklaard door de activiteit van de moederlijke lever, die het bilirubine, dat inmiddels deze lever is gepasseerd, heeft omgevormd. Om deze veronderstelling te toetsen, werd bij een waarschijnlijk uitgerekende aap een intraveneuze bilirubinebelastingsproef gedaan. (Figuur 4).

Uit deze figuur blijkt, dat 1 minuut na de injectie reeds een stijging van het direct reagerende bilirubine, gemeten volgens MALLOY en EVELYN (1937), is opgetreden in het perifere bloed.

Onze conclusie is, dat onder de beschreven proef omstandigheden het bilirubine door de met die van de mens verregaand vergelijkbare haemochoriale placenta van de aap nagenoeg ongeconjugerd van de foetus naar de moeder doorgaat.

De gevonden discrepantie tussen de overgang van het bilirubine en het J^{131} , in mogelijke tegenstelling tot hetgeen door SCHMID e.m. (1959) bij de placenta van de cavia werd gevonden, onderstreept wellicht nog eens het feit, dat de permeabiliteit van de haemochoriale apen placenta niet zonder meer met die van de cavia mag worden vergeleken. Opgemerkt moet evenwel, dat SCHMID e.m. (1959) niet hebben vermeld,



Figuur 4: à terme Rhesus aap (*Macacus Mulatta*) onder narcose; bilirubine i.v. bij de moeder ingespoten; het bloed werd afgenomen uit de vena femoralis.

of zich mogelijk niet aan albumine gebonden J^{131} in de door hen ingespoten oplossing heeft bevonden.

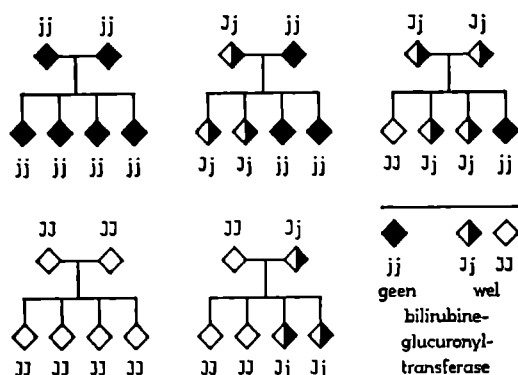
Samenvatting

Een experimenteel onderzoek over de bilirubine stofwisseling van de ongeboren Rhesusaap bij instand gebleven zwangerschap wees uit, dat bilirubine ongeconjugeerd van de foetus naar de moeder doorging.

DE BILIRUBINE STOFWISSELING VAN DE GUNN RAT

A. De geelzucht van de Gunn rat

In 1934 ontdekte de Canadese geneticus CH. K. GUNN bij Wistar ratten een recessief erfelijke geelzucht (figuur 5), die als een mutatie in de rattenkolonie van de Connaught Laboratories was ontstaan.



Figuur 5: De recessieve erfelijkheid van de geelzucht van de Gunn rat.

Het bleek n.l., dat drie jongen uit een nest van dertien ratten, waarvan de ouders normale Wistar ratten leken, geel van kleur waren. In 1938 werd het bestaan van de Gunn rat beschreven. Het serum van de beschreven dieren was, anders dan dat van normale ratten, goud-geel van kleur. De indirecte reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH in het plasma bedroeg: 5,0—12,5 E; gemiddeld (bij 20 dieren): 9,8 E. De directe reactie was negatief. (GUNN, 1944).

MALLOY en LOWENSTEIN (1940), vonden (bij 20 dieren) een plasmabilirubine gehalte gelegen tussen de 4.5 en 7.5 mg.%. JOHNSON, SARMIENTO, BLANC en DAY (1959) vonden bij 27 volwassen dieren een gemiddeld serumbilirubine gehalte van $6,33 \pm$ (S.D.) 1,47 mg.%. Omstreeks de 15e levensdag was de concentratie het hoogst (maximaal 8—13 mg.%), om rond de 18e dag te dalen tot een constant peil van 5—7 mg.%. Dan werd de urine geel van kleur, hoewel er geen bilirubine in aantoonbaar was (GUNN, 1938, 1944; JOHNSON, GARCIA, FIGUEROA en SARMIENTO, 1961).

De huid en het bindweefsel waren icterisch; de spieren, de lymfklieren, de ge-

hele tractus digestivus, het pancreas, het hart, de longen, de bijnieren, de bijschildklieren en de hypofyse hadden hoogstens een lichtgele kleur. In de schildklier bevond zich een bijna zwart pigment. Het beenmerg vertoonde geen afwijkingen. Het microscopisch onderzoek van lever, nieren en beenmerg bracht geen afwijkingen aan het licht. (MALLOY en LOWENSTEIN, 1940). Bij volwassen icterische dieren was aan de top van de nierpyramiden een oranje verkleuring te zien (BLANC en JOHNSON 1959), veroorzaakt door de aanwezigheid van ongeglucuronideerd bilirubine (BURNSTINE en SCHMID, 1962).

De oorzaak van de geelzucht bij de homozygote Gunn rat

GUNN nam aan, dat de oorzaak van de icterus een versterkte haemolyse was. Hij vond n.l. in een enkel geval microcytose van de erythrocyten. De gemiddelde diameter van erythrocyten van Wistar ratten was $6,2 \pm 0,0289$ (niet werd vermeld of dit de standaarddeviatie was) micron, tegen $5,0 \pm 0,257$ micron van de gele rat (GUNN, 1944).

Als gevolg van deze opvatting trachtte GUNN (1944) de icterus te genezen door bij 10 volwassen gele ratten, splenectomie te verrichten, maar 6 weken later waren de dieren nog steeds icterisch. MALLOY en LOWENSTEIN (1940) vonden, dat de erythrocyten van Gunn ratten een normale diameter hadden. Ook de resistance globulaire was normaal. Het bleek, dat het serum van Gunn ratten een door saponine veroorzaakte haemolyse nog sterker kon remmen dan serum van normale Wistar ratten. Het haemoglobinegehalte van 20 Gunn ratten bedroeg 13,8–16,5 gr.%, het gemiddelde van 20 normale Wistar ratten: 16,0 gr.%. Het reticulocyten aantal van Gunn ratten wisselde van 2–17%, het gemiddelde van de normale ratten was 3%.

Op grond van het feit, dat het bilirubine in verse gal en urine in de reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH meestal direct reageert, namen MALLOY en LOWENSTEIN (1944) aan, dat de vorming van dit direct reagerend bilirubine voor de uitscheiding in de gal en urine een conditio sine qua non was. Spoten zij bilirubine bij ratten met een afgebonden galgang in, dan ontstond een (gedeeltelijk) directe bilirubinaemie. Dit laatste was niet het geval bij ratten zonder lever en bij Gunn ratten. Werde de galgang van normale ratten afgebonden, dan bleek een voornamelijk directe bilirubinaemie te ontstaan. Bij Gunn ratten werd hierdoor voornamelijk een indirecte bilirubinaemie veroorzaakt. Uit deze waarnemingen moest besloten worden, dat de oorzaak van de icterus van de homozygote Gunn rat een onvoldoende vorming van direct reagerend bilirubine in de lever was.

Glucuronyltransferase deficiëntie ten opzichte van o.a. bilirubine

Nadat gebleken was, dat bilirubineglucuronide een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH geeft, ontdekten LATHE en WALKER (1957), CARBONE en GRODSKY (1957), GRODSKY en CARBONE (1957) en SCHMID, AXEL-ROD, HAMMAKER en ROSENTHAL (1957) vrijwel gelijktijdig, dat suspensies en microsomen van levers van homozygote Gunn ratten in vitro, zelfs na toevoeging van een overmaat aan UDPGA niet in staat waren o-aminophenol en bilirubine aan glucuronzuur te binden.

LATHE en WALKER (1957, 1958) vonden, dat de leverschijven van een

Gunn rat, in tegenstelling tot suspensies hiervan, een geringe hoeveelheid o-aminophenolglucuronide konden vormen.

De ontdekking van dit tekort aan bilirubineglucuronyltransferase won aan belang, toen bleek, dat eenzelfde tekort in de lever van pasgeboren kinderen bestond. (LATHE en WALKER, 1958).

Dat dit tekort niet schijn was, met name een gevolg van een overmatige β -glucuronidase activiteit in de lever, werd bewezen door tijdens de proef het β -glucuronidase met K-saccharaat of 1,4-saccharolacton te remmen. Ook dan bleek de mogelijkheid tot vorming van direct bilirubine door de lever van de homozygote Gunn ratten (CARBONE en GRODSKY, 1957) en de pasgeborenen (LATHE en WALKER, 1958) afwezig.

Nader onderzoek toonde aan, dat anthranilzuur en menthol eveneens (SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en ROSENTHAL, 1957) door de Gunn ratten lever in vitro niet konden worden geglucuronideerd. Voor o-aminobenzoaat daarentegen werd door SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en SWARM (1958) in vivo geen afwezigheid doch wel een sterk verminderde glucuronidering gevonden.

De afwezigheid van glucuronyltransferase bleek niet beperkt tot de lever van de Gunn rat. In homogenaten en schijven van de nier, de maag, het duodenumslimvlies en de subcorticale hersenen was het vermogen tot glucuronidering van bilirubine, o-aminophenol, 4-methylumbelliferon en o-aminobenzoaat duidelijk minder dan in de organen van normale ratten of zelfs afwezig. (ARIAS, 1959b; ARIAS, JOHNSON en WOLFSON, 1960).

SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en SWARM (1958) vonden, dat vrijwel onmiddellijk na i.v. toediening van bilirubineglucuronide aan Gunn ratten deze stof in grote hoeveelheden in de gal kwam. Het bilirubinegehalte van de gal van 5 gele ratten werd onderzocht en bleek 3,32 mg.% (\pm SD. 1,04 mg.%) te bedragen. Bij papierchromatographie konden geen azoderivaten van bilirubine gevonden worden, doch wel een kleine hoeveelheid andere azoderivaten, welke dezelfde Rf hadden als de azoderivaten van kristallijn bilirubine. In de gal bevonden zich eveneens enige gele pigmenten, welke in de reactie van HIJMAN VAN DEN BERGH negatief reageerden. Nagenoeg al het galpigment van normale en van heterozygote Gunn ratten bestond uit bilirubineglucuronide.

Hoewel in leverschijven en -microsomen van heterozygote Gunn ratten een gering tekort aan o-aminophenol (LATHE en WALKER, 1958), 4-methylumbelliferon- en bilirubineglucuronyltransferase (ARIAS, 1959b) werd gevonden, hebben deze dieren geen icterisch serum. SCHMID (1960) vond, dat de glucuronidering van o-aminobenzoaat door heterozygote Gunn ratten in vivo was verminderd.

Leverschijven van Gunn ratten kunnen aniline glucuronideren (ARIAS, 1961). Wijzelf (VAN LEUSDEN, BAKKEREN, ZILLIKEN en STOLTE, 1962) von-

den, dat levermicrosomen van volwassen Gunn ratten p-nitrophenol even goed glucuronideren als levermicrosomen van normale ratten, maar dat het p-nitrophenol glucuronyltransferase in de homogenaten en de microsomen van de levers van pasgeborenen ontbreekt en bijgevolg volwassen Gunn ratten wat betreft het p-nitrophenol glucuronyltransferase gehalte niet met pasgeboren kinderen te vergelijken zijn.

De kleur van de faeces van Gunn ratten is even donker als die van niet icterische dieren. Blijkens het onderzoek van de faeces moet aangenomen worden dat de uitscheiding van urobiline (MALLOY en LOWENSTEIN, 1940; SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en SWARM, 1958) bij de icterische ratten verminderd is.

De volgende bepalingen bij Gunn ratten gaven normale uitkomsten:

- prothrombinetijd (MALLOY en LOWENSTEIN, 1940)
- test volgens TARATA ARA (MALLOY en LOWENSTEIN, 1940)
- broomsulfonfthaleïne uitscheiding (MALLOY en LOWENSTEIN, 1940).
- glucose-6-phosphatase in de lever (ARIAS, 1959b)
- esterase in de lever (ARIAS, 1959b)
- glycine conjugering (SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en ROSENTHAL, 1957)
- uitscheiding van cholografine (SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en SWARM, 1958; SCHMID, 1959)

Volgens GUNN zou er een polyurie bestaan, die soms tot tienmaal de hoeveelheid urine van de normale ratten gaat, en niet te beïnvloeden is door subcutane toediening van hypophyseachterkwabextract.

Eigen waarnemingen:

Wijzelf konden bij 5 volwassen gele ratten met onmiskenbare neurologische afwijkingen geen polyurie aantonen: de urineproductie van Gunn ratten gemeten gedurende 3 etmalen wisselde tussen de 5 en 14 ml. per etmaal tegen 7—15 ml. per etmaal bij 5 normale ratten.

B. Is de oorzaak van de neurologische stoornissen van de Gunn rat vergelijkbaar met de kernicterus van de pasgeborene?

Een deel van de Gunn ratten vertoont (GUNN, 1938) neurologische afwijkingen: karakteristiek is een eversie van de achterpoten. Hiermee gaat een waggelende gang gepaard. JOHNSON, SARMIENTO en DAY (1958) waren van mening, dat de oorzaak van de neurologische stoornis van de homozygote Gunn rat te vergelijken zou zijn met de kernicterus van de pasgeborene. Aangezien wij op verscheidene gronden — zoals blijken zal — twijfelen aan het identiek zijn van de afwijkingen in het centrale zenuwstelsel bij de Gunn rat met die bij de pasgeborene met kernicterus, zullen wij in het nu volgende nader op de door JOHNSON e.m. (1958) gegeven argumenten ingaan.

JOHNSON, SARMIENTO, BLANC en DAY (1959) stelden de volgende criteria op voor het bestaan van „kernicterus” bij homozygote Gunn ratten:

1. Duidelijke neurologische stoornissen bij levende icterische dieren.
 2. Kanariegele verkleuring van hersen- en/of ruggemerkskernen post mortem.
 3. Blijvende aanwezigheid gedurende enige weken van een gele verkleuring in de hersenen, wanneer de hersenen in formaline werden gefixeerd.
- (Dit criterium ontleenden JOHNSON e.m. (1959) waarschijnlijk aan SCHMORL (1904).

die heeft beschreven, dat de gele verkleuring in de hersenen van kinderen met kernicterus bleef bestaan bij het fixeren in formaline)

- 4 De aanwezigheid van een intracellulair pigment in vriescoupes van hersenweefsel. (Er wordt niet vermeld of dit pigment geel is)
5. Zenuwceldegeneratie bij microscopisch onderzoek

In feite blijken nu de schrijvers slechts het 1e en het 5e criterium te hanteren voor het stellen van de diagnose kernicterus van de Gunn rat, hetgeen bygevolg ten onrechte geschiedt. Immers: voor deze diagnose is toepassing van de criteria 2 en 3 en misschien 4 (icterus in het CZS!) een conditio sine qua non, waaraan, zoals blijken zal, bij hun waarnemingen, slechts onder kunstmatige omstandigheden is voldaan. Zij schrijven: „A presumptive diagnosis of kernicterus is reasonable in living subjects with jaundice or a past history of jaundice if they display characteristic nervous abnormalities”

De schrijvers vermelden slechts zelden welk van deze 5 criteria werd gehanteerd, en dan betreft dit nog slechts enkele uitzonderlijke gevallen, zonder dat duidelijk wordt aangegeven in welk percentage aan deze afzonderlijke criteria werd voldaan. Deze uitzonderlijke gevallen betreffen waarnemingen, welke onder kunstmatige omstandigheden (zie verder) verkregen werden

Een duidelijk voorbeeld van het willekeurig hanteren van meer dan een criterium, dat afzonderlijk niet op kern-icterus behoeft te wijzen is het volgende. „The incidence of classical signs of kernicterus or of localized yellow staining at postmortem examination is relatively constant, however, regardless of intercurrent infection” Vooral het 3e criterium interesseerde ons ten eerste nergens blijkt uit het onderzoek van JOHNSON e m (1959) hoeveel van de door hen onderzochte dieren spontaan, (en niet behandeld met inspuitingen van bilirubine of Na sulfisoxazol per os, zie verder) post mortem een kanariegele verkleuring van de hersenkernen vertoonden

De schrijvers stellen uitdrukkelijk, dat er bij geen enkel dier na de vierde levensweek een gele verkleuring van de hersenen werd gevonden bij dieren van vier weken of ouder „with a clinical history of kernicterus” was het verlies van ganglioncellen de enige afwijking die door JOHNSON e m (1959) werd gevonden

Vertoonden de Gunn ratten tijdens het leven geen neurologische stoornissen, of (let wel) post mortem geen duidelijke gele verkleuring van het centrale zenuwstelsel, dan vonden JOHNSON e m (1959) geen afwijkingen bij het microscopisch onderzoek van de hersenen

Van 135 icterische dieren van de stam, welke JOHNSON, SARMIENTO en DAY (1958) ter beschikking stond kregen er 65% neurologische stoornissen Een deel van deze dieren met neurologische stoornissen ging dood voor de volwassen leeftijd werd bereikt de helft van de tot op volwassen leeftijd in leven gebleven icterische dieren vertoonde neurologische stoornissen

De neurologische afwijkingen ontstonden nagenoeg altijd in de eerste drie levensweken (BLANC en JOHNSON, 1959), en bijna nooit vóór de zevende levensdag De volgorde was ataxie, incoördinatie, hypotonie, prikkelbaarheid, gewichtsverlies, athetose, opisthotonus, krampen (clonisch) en de dood (meestal in de 3e—4e levensweek) (JOHNSON e m, 1959)

Er bestaat geen twijfel over — Gunn zelf heeft hier reeds op gewezen — dat de Gunn ratten in grote getale neurologische stoornissen verto-

nen. De oorzaak van deze stoornissen is in het centrale zenuwstelsel aantoonbaar: in de hersenen van Gunn ratten, welke de eerste twee levensweken hadden overleefd, bleken er in paraffinecoupes cellen ten gronde te zijn gegaan. Dit gebeuren ging gepaard met een matige gliose (JOHNSON, SARMIENTO en DAY, 1958; DAY en JOHNSON, 1959).

De eerste verandering waartoe de aangedane cellen neigen, was het aannemen van de spherische vorm. Het cytoplasma werd korrelig, de kern kwam perifeer te liggen en de kernomtrek vervaagde; later ontstond pyknose, of (minder vaak) karyolyse. De granulae in het cytoplasma werden grof en onregelmatig; de cel schrompelde, onderging lysis en liet gekorrelde gepigmenteerd (niet wordt vermeld of dit geel was) materiaal los. Later trad phagocytose op. (BLANC en JOHNSON, 1959). Pathologisch anatomisch onderzoek van de hersenen, nadat de dieren de kritieke periode hadden overleefd, liet als enige afwijking een gliaproliferatie zien. In het centrale zenuwstelsel waren aangedaan: de hippocampus, de thalamus, de globus pallidus, het putamen, de nucleus caudatus, de bulbus olfactorius, de lobus pyramidalis, de hersenstamkernen, de substantia nigra, de nucleus ruber, het corpus subthalamicum, de colliculi inferiores en superiores, de olivae, formatio reticularis, de kernen van de derde, de vijfde en de achtste kopzenuw, de flocculi en de paraflocculi, de nucleus dentatus, het cerebellum, de grijze stof van het ruggemerg, en (zelden) de cortex cerebri. De schrijvers geven louter een opsomming en vermelden niet of deze afwijkingen in alle onderzochte hersenen voorkwamen, of slechts in een bepaald percentage.

De schrijvers (JOHNSON e.m., 1959) vermelden wel, dat, „it was also difficult to differentiate the above lesions from the „normal“ artefacts of shrinkage, basophilia, or pallor of ganglion cells observed also in controls.” De schrijvers zeggen ook, dat „we cannot completely exclude the possibility of mild changes occurring before bilirubin staining”.....

Bij welke (sporadische) dieren blijken JOHNSON e.m. (1959) nu bilirubine (of althans een geel pigment) in de hersenen te hebben gezien? Bij het nauwkeurig lezen van het artikel van JOHNSON, SARMIENTO, BLANC en DAY (1959) blijken de er in voorkomende afbeeldingen van de plaatselijke verkleuringen van het hersenweefsel van Gunn ratten en van de aanwezigheid van bilirubine in een ganglioncel te berusten op waarnemingen bij één dier van 18 dagen, dat een subcutane inspuiting van 0,7 mg. bilirubine had gekregen. De afbeeldingen van de vriescoupes van de hersenen van Gunn ratten, waarin celbeschadigingen zichtbaar waren, waren afkomstig van ratten van 11 en 12 dagen oud, welke gedurende enige dagen met respectievelijk 100 en 500 mg./kg. van een sulfonamide (respectievelijk een niet nader aangeduid sulfonamide en Na-sulfisoxazol) waren belast. Het is bekend, dat sulfonamides bilirubine uit de binding aan het albumine in de bloedbaan kunnen losmaken (ODELL, 1959).

Eigen waarnemingen I:

Wij hebben zelfs deze, onder onphysiologische omstandigheden gedane, waarnemingen van JOHNSON e.m. (1959) in onze rattenkolonie niet kunnen bevestigen. Bij vier Gunn ratten spoten wij op de 14e levensdag 1 of 2 mg. bilirubine subcutaan in. De neurologische stoornissen namen sterk toe. Op de 15e levensdag werden de dieren gedood. Er bleek thans wel een diffuse gele verkleuring van de hersenen aanwezig te zijn, echter zonder dat er bij twee van deze dieren macroscopisch of met de praepareermicroscop een duidelijke ophoping van de gele kleurstof op bepaalde plaatsen was opgetreden. Bij de twee andere dieren waren bij het microscopisch onderzoek van de vriescoupes van de hersenen geen bilirubine kristallen te vinden. Ook in de hersenen van deze twee dieren was geen afgegrensde gele verkleuring van bepaalde plaatsen van de hersenen opgetreden.

Eigen waarnemingen II:

Bij een reeks van 50 jf ratten, waarvan tussen de 1e en de 50e levensdag op iedere levensdag 1 dier werd gedood, werd bij alle dieren tussen de 9e en de 21e levensdag een diffuse lichtgele verkleuring van de hersenen gevonden, zonder dat er op bepaalde plaatsen (macroscopisch en met de praepareermicroscoop waargenomen) een duidelijk afgegrensde verkleuring bestond. Wij vonden tevens, dat 26%*) van de dieren in de ons ter beschikking staande stam duidelijke neurologische stoornissen vertoonden. Hoewel alle dieren tussen de, 9e en de 21e dag een lichtgele diffuse verkleuring van de hersenen vertoonden, was dus slechts 26% van de dieren evident neurologisch gestoord.

Eigen waarnemingen III:

Bij twee van de dieren, die tussen de 9e en de 21e dag een lichtgele diffuse verkleuring van de hersenen hadden, hebben wij de hersenen tot brij gemaakt en met chloroform geëxtraheerd, zoals VOGEL (1953) heeft gedaan met de hersenen van kinderen met kernicterus. Na het verdampen van dit chloroformextract waren daarin geen bilirubinekristallen onder het microscoop te vinden. WATERS, RICHERT en RAWSON (1954) vonden op deze wijze bij kinderen met kernicterus wel bilirubinekristallen.

Eigen waarnemingen IV:

Wij hebben de veronderstelling van JOHNSON e.m. (1958), dat de oorzaak van de neurologische stoornissen van de homozygote Gunn rat en de kernicterus van de pasgeborene identiek zijn, op nog een andere wijze getoetst.

Hierbij zijn wij uitgegaan van de mededelingen van CROSSE, MEYER en GERRARD, (1955) en BYERS, PAINE en CROTHERS (1955), die beschreven, dat bij een deel van de kinderen, welke een icterus neonatorum hadden doorgemaakt, een perceptiedoofheid bestond, zelfs „in the absence of athetoid cerebral palsy.” (FISCH en NORMAN, 1961). Zoals vermeld, vonden JOHNSON e.m. (1959) ook ophoping van een geel pigment in de kernen van de achtste kopzenuw. Niet duidelijk werd door deze schrijvers vermeld of deze dieren met bilirubine of sulfonamide zijn belast. Wij hebben de audiogrammen van niet duidelijk neurologisch gestoorde en van onmiskenbaar neurologisch gestoorde Gunn ratten vergeleken met die van normale Wistar ratten.

Bij 2 JJ en bij 2 jf volwassen mannelijke ratten werden audiogrammen* gemaakt. De dieren wogen 230-280 gram. De gewenste frequentie en intensiteit van het geluid werden opgewekt met een toongenerator. Het geluid werd via een luidspreker gebracht in een verlichte geluidsarme kooi. De afmetingen van deze kooi waren: lengte 85 cm, diepte 45 cm, hoogte 55 cm. De wanden waren bekleed met een geluidafdichtend materiaal. Aan de voorzijde van de kooi bevond zich een ruit, waardoorheen de reacties van het dier waargenomen konden worden.

Het dier ontving via de vloer van de kooi een elektrische schok even na een geluid van een bepaalde frequentie en intensiteit. De ratten reageerden na een aantal oefeningen op het geluid met een karakteristieke afwachterende houding en een eigenaardig inhouden van de adem. Deze voorwaardelijke reflex werd gebruikt om na te gaan of de rat het geluid had waargenomen. Er werd zorgvuldig voor gewaakt, dat er geen onvermoede en ongewenste voorwaardelijke reflexen waren ingeslopen, bijvoorbeeld het reageren op een bepaalde beweging van de experimentator. Telkens werden een

*) Van 119 willekeurige vrouwelijke dieren, van welke werd genoteerd, of zij waggelden of beefden bleken er 21 te waggelen en 10 te beven.

* voor de medewerking van de biotechnicus J. Reitsma en de heer A. van Vleuten (technisch assistent van de afdeling Audiologie) willen wij onze erkentelijkheid betuigen.

jj dier en een JJ dier onmiddellijk na elkaar getest. De volgorde waarin werd getest was telkens verschillend.

Bij het eerste paar geteste ratten (een jj ♂ (serumbilirubineconcentratie 6,4 mg.%), zonder neurologische afwijkingen, en een JJ ♂) bleken, onder deze omstandigheden, geen belangrijke verschillen te bestaan tussen de drempelwaarden van dezelfde frequentie. De frequenties tussen 1000 en 14.000 Hz werden getest. Ook bij een tweede paar geteste ratten bleken er geen verschillen tussen jj en JJ aanwezig te zijn. (zie tabel 10). Dit jj dier vertoonde een waggelgang, grove tremoren, en een eversie van de achterpoten. De serumbilirubineconcentratie was 9,2 mg.%.

Tabel 10

audiogram van een onmiskenbaar neurologisch gestoorde Gunn rat, vergeleken met dat van een normale Wistar rat.		
De drempelwaarde van het geluid in decibel		De frequentie van het geluid in Hz.
JJ	jj	
+ 35	+ 40	1000
+ 31	+ 35	2000
+ 30	+ 34	3000
+ 30	+ 20	4000
0	+ 4	5000
+ 5	+ 10	6000
+ 15	+ 10	7000
+ 5	0	8000
- 3	0	9000
0	- 2	10000
- 10	+ 3	11000
- 10	- 8	12000
- 20	- 18	13000
- 25	- 30	14000

Ook wat het vóórkomen van perceptie doofheid betreft is dus de kernicterus van de pasgeborene waarschijnlijk niet te vergelijken met de neurologische stoornissen van de Gunn rat.

Opmerkelijk is dat BLANC (1961) bij spectrophotometrisch onderzoek van de hersenen van Gunn ratten een absorptiemaximum bij 410 m μ vond. Hij wijst erop, dat dit absorptiemaximum verschilt van dat van chloroform extracten van de icterische kernen van kinderen met kern-icterus, dat volgens deze auteur bij 460 m μ zou liggen. Ook op deze wijze

onderzocht blijkt de neurologisch gestoorde Gunn rat te verschillen van de aan kernicterus lijdende pasgeborene.

Aangezien bij de ter obductie gekomen gevallen van kinderen met kernicterus *een duidelijke geelkleuring van bepaalde delen van de hersenen* wordt gevonden (ORTH, 1875; SCHMORL, 1904; ZIMMERMAN en YANNET, 1933; BECKER en VOGEL, 1948; BIEMOND, 1950; VOGEL, 1953; BOYD, 1954; CLAIREAUX, 1961) moet onze conclusie zijn, dat de argumenten van JOHNSON e.m. (1958, 1959) niet voldoende zijn om de oorzaak van de afwijkingen in het centrale zenuwstelsel bij de Gunn ratten identiek te stellen met die van de pasgeborene met kernicterus.

Wij zijn op het vraagstuk van de oorzaak van de neurologische stoornissen van de Gunn rat daarom zo uitvoerig ingegaan, omdat er bij de Gunn ratten pubertas praecox voorkomt (zie verder), en het ter verklaring hiervan van groot belang zou kunnen zijn dat afgegrensde, door bilirubine veroorzaakte, hersenbeschadigingen zouden bestaan. Anderzijds achten wij het van belang er op te wijzen, dat de in de literatuur doordringende, op de artikelen van JOHNSON e.m. (1958, 1959) berustende opvatting, dat de Gunn rat zonder meer als een experimenteel model voor de kernicterus van de pasgeborene zou kunnen dienen, niet aanvaardbaar is.

Samenvatting: de mening van JOHNSON e.m. (1959, dat de oorzaak van de neurologische stoornissen van de Gunn rat te vergelijken zou zijn met de kernicterus van de pasgeborenen achten wij niet juist op de volgende gronden:

- a. De door JOHNSON e.m. (1959) gehanteerde criteria zijn onduidelijk en hebben nagenoeg nooit betrekking op kern-icterus.
- b. De waarnemingen van JOHNSON e.m. (1959) hebben wij in onze rattenkolonie *niet* kunnen bevestigen.
- c. De door JOHNSON e.m. (1959) gegeven voorbeelden van icterus in de hersenen berusten op waarnemingen onder onphysiologische omstandigheden. Zelfs deze konden wij voor een deel *niet* bevestigen.
- d. De perceptiedoofheid, welke bij een deel van de pasgeborenen door een hyperbilirubinaemie zou worden veroorzaakt, hebben wij bij de door ons onderzochte Gunn ratten *niet* kunnen vinden.

HOOFDSTUK IV

HET SYNDROOM VAN DE GUNN RAT BIJ DE MENS

In 1952 beschreven CRIGLER en NAJJAR een zeldzame vorm van voortdurende geelzucht van de mens: hun mededeling betrof 7 kinderen met congenitale familiale non haemolytische geelzucht en neurologische stoornissen. De moeders van deze kinderen waren afkomstig uit drie verwante families. De geelzucht ontstond op de tweede of derde levensdag en was gedurende het gehele leven aanwezig; 6 van de 7 kinderen kregen neurologische stoornissen in de eerste levensweek en stierven in het eerste levensjaar. Later (CHILDS en NAJJAR, 1956) werden twee kinderen van 5 en 2 jaar beschreven, bij wie neurologische stoornissen ontbraken. ROSENTHAL, ZIMMERMAN en HARDEY (1956) deelden mede, dat

Tabel 11

Het tekort aan glucuronyltransferase bij het syndroom van CRIGLER-NAJJAR.			
In vivo		In vitro (lever)	
aglycon	auteurs	aglycon	auteurs
menthol	} PETERSON en SCHMID (1957). SCHMID, AXEL- ROD, HAMMAKER en ROSENTHAL (1957)	bilirubine	SZABO, KOVACKS en EBREY (1962)
salicyl			
N.A.P.A.	} SZABO, KOVACKS en EBREY (1962)		
chloraalhydraat trichloorethanol tetrahydrocortison			
cortisol tetrahydrocortison			

zij bij een patiënt met de ziekte eerst op driejarige leeftijd neurologische stoornissen hadden gevonden. Mogelijk was de door JERVIS (1959) beschreven patiënte lijdend aan eenzelfde syndroom, hoewel door deze auteur niet kon worden gevonden, dat de aandoening familiair was.

De broomsulfonfthaleïne test en de cholografineuitscheiding waren bij drie onderzochte patiënten normaal. De gal was kleurloos en bevatte slechts sporen ongeconjugeerd bilirubine (SCHMID, AXELROD, HAMMAKER en ROSENTHAL, 1957).

In tabel 11 is aangegeven, welke stoffen verminderd bleken te worden geglucuronideerd. Uit deze tabel en de boven beschreven bevindingen kan men concluderen, dat bij patiënten met het syndroom van CRIGLER-NAJJAR een glucuronyltransferase tekort bestaat.

...

DE GLUCURONIDERING IN HET LICHAAM

A. De glucuronidering van bilirubine

COLE en LATHE (1953) hebben de galpigmenten uit de sera van patiënten met een haemolytische icterus en een obstructieicterus na het vrijmaken van eiwit, met behulp van „reverse phase chromatography” in twee soorten kunnen scheiden. De eerste soort was voornamelijk wateroplosbaar en gaf een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH, het tweede type bleek een indirecte reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH te geven.

In 1954 toonden COLE, LATHE en BILLING aan, dat het serum van patiënten met een obstructieicterus, evenals de gal uit een normale galblaas, pigment I en II bevatten. Beide pigmenten vertoonden een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH. De scheiding gelukte met „reverse phase chromatography” (zie ook BILLING, 1955a).

BILLING (1955b) vond bij obstructieicterus, dat, behalve dat de galpigmenten niet in de gal kwamen, er bovendien een remming van de overgang van het bilirubine naar het pigment I en van het pigment I naar het pigment II was.

In 1954 wist BILLING de door het bilirubine, het pigment I en het pigment II bij de reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH gevormde azopigmenten op een chromatogram te scheiden.

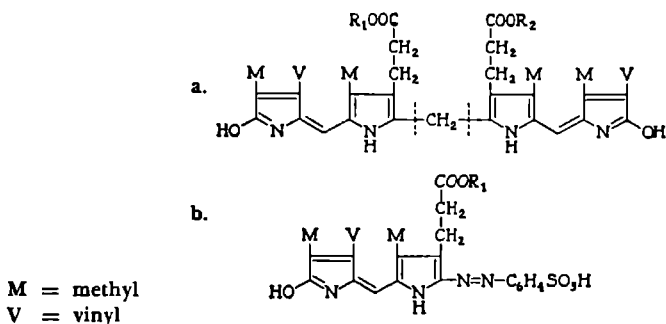
Deze azopigmenten op het chromatogram noemde zij het pigment A en het pigment B. Het bilirubine gaf op het chromatogram het pigment A; het pigment I en II leverden respectievelijk de pigmenten A en B en het pigment B.

De structuur van het pigment A was reeds lang bekend (FISCHER en HABERLAND, 1935). BILLING, COLE en LATHE (1957) meenden, dat het pigment B het monoglucuronide van het pigment A was. In 1956 hadden BILLING en LATHE al gesteld, dat het pigment II óf de mono- óf de diglucuronide vorm van het bilirubine zou kunnen zijn (figuur 6 en figuur 7).

Vrijwel gelijktijdig toonde TALAFANT (1956) (1957) door middel van papirelectrophorese van hondengal eveneens de aanwezigheid van het glucuronzuur in het direct reagerend pigment aan.

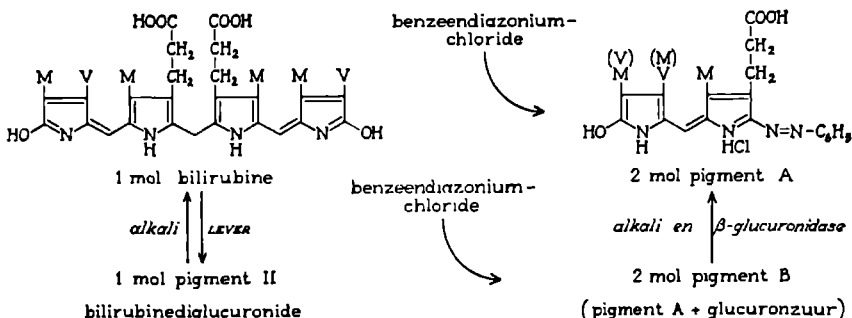
Ook SCHMID (1956) beschreef, dat het pigment B het glucuronide van het pigment A is. Hij zuiverde het pigment B door middel van papierchromatografie (zie ook SCHMID, 1957).

FISCHER en HABERLAND (1935) hadden gevonden, dat slechts één van de uit het bilirubine ontstaande dipyrrol componenten bij de reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH met het diazo-zout reageert tot azobilirubine (het pigment A). OVERBEEK, VINK en DEENSTRA (1955) vonden, dat bij de aanwezigheid van een voldoende hoeveelheid diazo-reagens een tweede, langzamer, reactie optrad, waarbij de andere helft van het bilirubine molecuul óók aan het diazozout wordt gekoppeld.



Figuur 6. De structuurformules van bilirubine en een dipyrrrolazopigment. Als R1 en R2 waterstof zijn is a. de formule van bilirubine.

Na diazotering worden twee moleculen ongeconjugeerd dipyrrrolazopigment (pigment A) gevormd (b.). Wanneer R1 of R2 glucuronzuur is, ontstaat de formule van bilirubinemonoglucuronide (a.) (pigment I), waaruit één molecuul pigment A en één molecuul dipyrrrol azopigment glucuronide (pigment B) ontstaat. Wanneer R1 en R2 glucuronzuurmoleculen zijn, is er sprake van bilirubine diglucuronide (a.) (pigment II), waaruit na diazotering twee moleculen pigment B ontstaan (b.).



Figuur 7. De relatie tussen bilirubine, pigment II, pigment A en pigment B.

Volgens de huidige opvatting wordt het bilirubine hoofdzakelijk of geheel met glucuronzuur geconjugeerd tot bilirubinemonoglucuronide (pigment I), of bilirubinediglucuronide (pigment II). Pigment I zou ook buiten de lever kunnen worden gevormd, pigment II uitsluitend in de lever. Is het leverparenchym beschadigd en schiet het in zijn conjugerend vermogen tekort, dan zou relatief meer pigment I gevormd worden. (BOLLMAN, 1959).

Het is evenwel bewezen (WEBER, SCHALM en WITMANS, 1963), dat het bilirubine monoglucuronide een equimoleculair complex is van twee stoffen: het bilirubine en het bilirubine diglucuronide. Dit betekent, dat het bilirubinemonoglucuronide niet een in de biologische verwerking voorkomende chemische zelfstandigheid is, maar een complex, dat zich vormt wanneer in een daartoe geschikt milieu (o.a. serum) het bilirubine en het bilirubinediglucuronide naast elkaar voorkomen.

Gaat men van deze zienswijze uit, dan wordt de opvatting van ZUELZER, REISMAN en BROWN (1961) onbegrijpelijk. Deze auteurs gaan er van uit, dat de vorming van het bilirubinemonoglucuronide buiten de lever geschiedt, en dat deze stof als zodanig bestaat. Zij achten het zeer waarschijnlijk, dat de volgens hen buiten de lever optredende vorming van het bilirubinemonoglucuronide bij vroeggeborenen deficiënt is, in tegenstelling tot de vorming van het diglucuronide uit het monoglucuronide in de lever. ZUELZER e.m. (1961) trachten nu te verklaren, waarom een hoge serumbilirubineconcentratie en het optreden van kernicterus niet altijd zijn gecorreleerd. Zij stellen, dat het meer wateroplosbare bilirubinemonoglucuronide in de hersenen minder gemakkelijk kan binnendringen dan het vrije bilirubine.

Het bilirubineglucuronide geeft dus een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH. Er zijn echter nog meer bilirubineverbindingen, die een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH geven.

Zo bewezen JIRSA, VECEREK en LEDVINA (1956), dat het door hen gesynthetiseerde di-taurobilirubine bij een zure pH een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH gaf.

SAKAMOTO (1956) wist uit hondengal een glucuronzuurvrije alkali-labele ester van het bilirubine te isoleren, welke een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH gaf.

ISSELBACHER wist in 1958 ook het sulfaat van het bilirubine in de gal aan te tonen. De sulfaatgroep was aan de hydroxylgroepen van het bilirubine gebonden. Dit bilirubinesulfaat gaf eveneens een directe reactie van HIJMANS VAN DEN BERGH. Daarnaast toonden ISSELBACHER en MC. CARTY (1959) een alkali-labele, glucuronzuur noch sulfaat bevattende azobilirubine fractie aan.

Het bilirubineglucuronide geeft een directe reactie. Geeft echter, omgekeerd, een stof een directe reactie, dan is daarmee dus niet aangetoond dat er bilirubineglucuronide is.

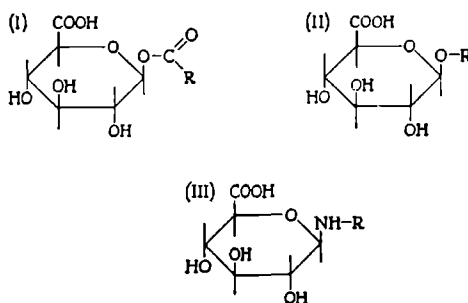
Bovendien bleek, dat het vrije bilirubine wel degelijk, zij het weinig bij afwezigheid van versnellers, met het diazoreagens reageert, en wel procentueel in grotere mate naar gelang de totale concentratie van het bilirubine kleiner wordt. Het is onjuist dit „direct” reageren te interpreteren als veroorzaakt door de aanwezigheid van het geconjugeerd bilirubine (zie o.a. SCHALM en WEBER, 1962).

B. De glucuronidering van andere stoffen dan bilirubine

Behalve het bilirubine ondergaan talloze physiologische stoffen en pharmaca vóór hun uitscheiding uit het lichaam een gehele of een gedeeltelijke glucuronidering. De wijze, waarop de chemische binding van deze stoffen in het lichaam aan het glucuronzuur geschiedt, is verschillend.

Men zou onderscheid kunnen maken tussen: (figuur 8)

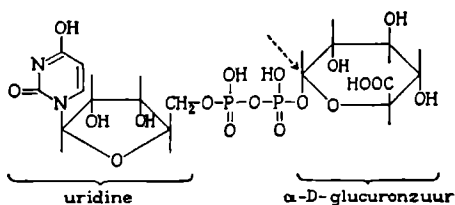
- I. een ester-glycosidische binding;
- II. een O-glycosidische binding;
- III. een N-glycosidische binding;



Figuur 8. de ester-, de O- en de N-glycosidische binding van het aglycon aan het glucuronzuur.

I. De voorstadia van de synthese van de glucuronides.

Tot 1951 was de synthese van de glucuronides slechts gelukt in lever-schijven. DUTTON en STOREY (1951) wisten als eersten de synthese van de glucuronides in leversuspensies te bewerkstelligen. De reactie bleek in de leversuspensies pas te verlopen na de toevoeging van leverextracten, welke o.a. met trichloorazijnzuur waren gemaakt. De factor, welke voor het verlopen van de reactie in de leversuspensies noodzakelijk was, werd door DUTTON en STOREY (1953) uit deze extracten gezuiverd. Deze factor was het UDPGA (zie figuur 9) (DUTTON en STOREY, 1953; DUTTON, 1955; DUTTON 1956).

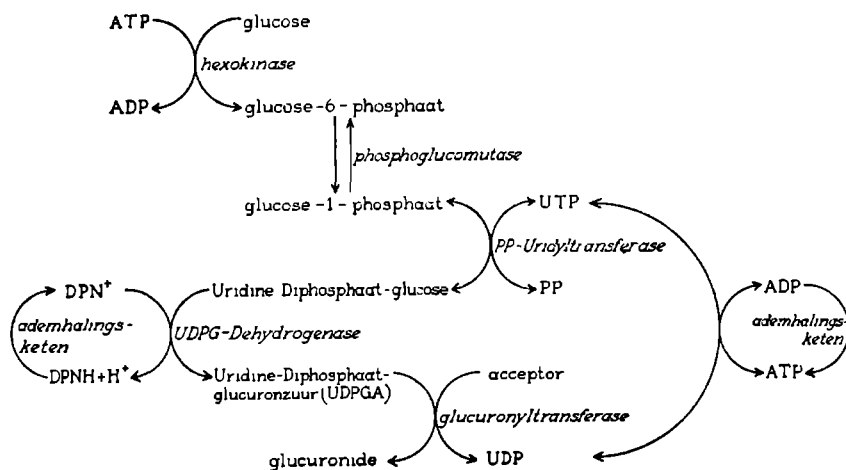


Figuur 9. Uridinedifosfaatglucuronzuur.

Bij de pijl grijpt het „transferase” aan. (zie verder).

Uit de α -glucosidische binding van dit nucleotide bleek (omkering volgens WALDEN) een β -glucuronide te ontstaan. De aanwezigheid van de levermicrosomen was voor deze omvorming noodzakelijk. Het in de levermicrosomen aanwezige enzym werd het *glucuronyltransferase* genoemd.

De synthese van glucuronides is schematisch in figuur 10 aangegeven.



Figuur 10. Synthese van glucuronides.

Het *UDPG-dehydrogenase* werd door STROMINGER, KALCKAR, AXELROD en MAXWELL, (1954) (zie ook: MAXWELL, KALCKAR en STROMINGER (1956) en STROMINGER, MAXWELL, AXELROD en KALCKAR, 1957) uit het cytoplasma van kalfslever gezuiverd.

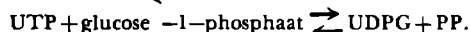
Dit enzym katalyseerde de volgende reactie:



Men kan de reactie volgen door de toeneming van de extinctie van het DPNH te meten bij 340m μ .

Het *UDPG dehydrogenase* is behalve in de nier ook in pneumococcen (SMITH, MILLS, BERNHEIMER en AUSTRIAN, 1958) gevonden. STROMINGER en MAPSON (1957) hebben het *UDPG-dehydrogenase* uit erwtenkiemplantjes gezuiverd.

Het *UDPG* ontstaat uit het *UDP*, dat bij de *glucuronyltransferase* reactie vrijkomt, op de volgende wijze:



Deze reactie wordt gekatalyseerd door het *UDPG-pyrophosphorylase*, dat voornamelijk in het levercytoplasma voorkomt. Dit *UDPG-pyrophosphorylase* wordt ook het *PP-Uridyltransferase* genoemd.

GINSBURG (1958) wist dit enzym 800 x gezuiverd uit *Phaseolus aureus* te isoleren.

Het *glucuronyltransferase* komt o.a. voor in de lever van de muis, de cavia, het schaap, de duif en de kikker. (DUTTON en GREIG, 1957). DUTTON en MONTGOMERY (1958) beschreven een in de lever van vissen voorkomend *glucuronyltransferase*, dat een temperatuur optimum had van 18—24° C. Er is ook een *glucuronyltransferase* aangetoond in de nieren

Tabel 12. Overzicht van de uit de literatuur en het eigen onderzoek vergaarde gegevens, waaruit tot het bestaan van meer dan één glucuronyltransferase kan worden besloten.

	Muizen	Caviae	Katten	JJ ratten	jj ratten	Konijnen
Schijven		(tractus digestivus) salicylg. geremd door benzoaat, m-hydroxy-, p-hydroxy-, o-methoxy-, en p-aminobenzoaat; ook door p-dipropylsulfanylbenzoaat en door bilirubine. (SCHACHTER, KASS en LAMMON, 1958 en 1959). 5	11 géén o-am.gl., maar wel bi.gl. (LATHE, en WALKER, 1958a)	Novobiocine remt de bi.gl. $\frac{1}{2}$, maar o-am.gl. $\frac{1}{3}$ (HARGREAVES en HOLTON, 1962). 12 Anthr. remt bi.gl. niet (LATHE en WALKER, 1958a). 13 o-am. remt bi.gl. (LATHE en WALKER, 1958a). 13a	Géén bi.gl. (LATHE en WALKER, 1958a). 24 $\pm \frac{1}{3}$ x normale o-am.gl. (LATHE en WALKER, 1958a). 25 Géén gl. van 4-m.-U.; wel gl. van aniline (ARIAS, 1961). 26	bi.gl. geremd door hoge conc. o-am. (LATHE en WALKER, 1958). 33
homogenaten en suspensies	Bi. gl. geremd door o-am. en o-am. gl. geremd door bi. (LATHE en WALKER, 1958a) 1 Bi. gl. door maken van suspensies verhoogd, maar o-am. gl. verminderd (LATHE en WALKER, 1958a) 2 Competitieve remming van o-am. gl. door benzoëzuur en α -ethylhexaanzuur (DUTTON, 1956) 3 Suspensie, die het meest actief was t.o.v. bi., was nauwelijks actief t.o.v. o-am. (LATHE en WALKER, 1958a). 4	o-am.gl., Ph.gl. en bi.gl. door progesteron geremd (HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMANN, 1960). 6		Novobiocine remt bi.gl. $\frac{1}{2}$, o-am.gl. $\frac{1}{3}$ (HARGREAVES en HOLTON, 1962). 14 o-am.gl. door serum van zwangeren geremd, en door pregnandiol, 3α , 20α ; allo-pregnantriol en pregnanolon (HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMANN, 1960). 15 o-am.gl., Ph.gl. en bi.gl. door progesteron geremd (HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMANN, 1960). 16 Serum van kraamvrouwen en steroiden remmen bi. en o-am.gl. niet (LATHE en WALKER, 1958b). 17 bi.gl. door maken van suspensies vergroot, maar o-am. gl. verminderd (LATHE en WALKER, 1958a). 18 Synkavite, chloromycetine en streptomycine remmen bi.gl., maar penicilline, tetracycline, erythromycine, hydrocortison en gantrisine niet (WATERS, DUNHAM en BOWEN, 1958). 19 4-methyl-1,4-naphthoquinon remde bi.gl., maar „Konakion” en „Synkavite” niet (TALAFANT en TOVAREK, 1959). 20 Borneol remt bi.gl.(GRODSKY en CARBONE, 1957). 21 Lever, welke het meest actief was t.o.v. bi. was nauwelijks actief t.o.v. o-am. (LATHE en WALKER, 1958a). 22	P-n.gl.normaal(VAN LEUSDEN, BAKKEREN, ZILLIKEN en STOLTE, 1962). 27 evenals M-nitrophenol gl. 28 Pasgeboren jj ratten hebben verlaagde P-n.gl., maar pasgeboren JJ ratten normale P-n.gl. 29 Lever en nier gl. o-am. en bi. niet (CARBONE en GRODSKY, 1957). 30	O-am.gl. 3 x zo snel als bi.gl. (LATHE en WALKER, 1958a). 34
microsomen		o-am.gl., Ph.gl. en bi.gl. door progesteron geremd (HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMANN, 1960). 7 o-am.gl., P-n.gl. en 4 m.-u. gl. door pregnandiol, Δ - 17α -methyltestosteron, testosterone, pregnandiol-glucuronide, 17α -methyltestosteron, 6α -methyl- 7α -hydroxyprogesteron en 17α -ethyl- 19 -nortestosteron, geremd, maar niet door cholesterol, pregnandion, pregnenolon, 17α -hydroxyprogesteron, cortison, oestradiol, oestron, progesteron en methylandrosteendiol. Pregnanidiolglucuronide en 17α -ethyl- 19 -nortestosteron remden competitief (DOWBEN en HSIA, 1962). 8 Mogelijk wordt de Ph.gl. o.i.v. serum van pasgeborenen geremd, maar niet door serum van kraamvrouwen. (TJON SIE KIE, 1961). 9 Phenolen en carbonzuren remmen anilinegl. (AXELROD, INSCOE en TOMKINS, 1958). 10		Diverse steroiden remmen ph.gl. (HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMANN, 1960). 23	P-n.gl. normaal (VAN LEUSDEN, BAKKEREN, ZILLIKEN en STOLTE, 1962). 31	
Opgelost en gedeeltelijk gezuiverd enzym						Na slangengif behandeling van de microsomen géén anilinegl., maar wel van bi. en anthr.; anthr. remde P-n. gl. competitief (ISSELBACHER, CHABRAS en QUINN, 1962). 35 Na slangengif behandeling geen bi.gl. (zie verder). Aantal steroiden remmen P-n.gl., pregnandiol remde P-n.gl. zelfs competitief (zie verder). 36

AFKORTINGEN, gebruikt in Tabel 12.

o-am. benz.	o-aminobenzoaat
o-am. an.	o-aminophenol
anthr.	aniline
NAPA	anthranilzuur
bi.	n-acetyl-p-aminophenol
gl.	bilirubine
JJ-rat	glucuronidering
Jj-rat	normale Wistar rat
jj	heterozygote Gunn rat
menth.	homozygote Gunn rat
ph.	menthol
P-n	phenolphthaleïne
4m-U	p-nitrophenol
	4-methylumbelliferon

(DUTTON en STEVENSON, 1959), in de foetale (STEVENSON en DUTTON, 1962) en de volwassen (DUTTON, 1958; HARTIALA en LEHTINEN, 1959) tractus digestivus, en in het bindweefsel. (BOLLET, GOODWIN, en BROWN, 1959).

II. Is er meer dan één glucuronyltransferase?

In de tabel 12 wordt een overzicht gegeven van de uit de literatuur en het eigen onderzoek vergaarde gegevens, waaruit tot het bestaan van meer dan één glucuronyltransferase kan worden besloten.

Naar aanleiding van tabel 12 willen wij opmerken, dat er slechts één argument (10) bestaat, waaruit mogelijk zou kunnen volgen, dat de vorming van ester-, O- en N-glycosides door slechts één glucuronyltransferase wordt bewerkstelligd; 6, 7, 13a, 16, 21, 30, 33 en 35 zouden er op kunnen wijzen, dat de ester- en etherglucuronides een gemeenschappelijk glucuronyltransferase hebben. De meeste waarnemingen duiden er evenwel op, dat voor de ester-, O- en N-glycosides drie verschillende glucuronyltransferases bestaan. Er bestaan zelfs argumenten om aan te nemen, dat er voor de vorming van de verschillende ether-glucuronides (8, 17, 32 en 37) meer dan één glucuronyltransferase bestaat.

De N-glucuronides worden hoogst waarschijnlijk door een afzonderlijk glucuronyltransferase gevormd. Hiervoor zijn twee argumenten aan te voeren: op de eerste plaats vonden ISSELBACHER e.m. (1962) na gedeeltelijke zuivering van het enzym, dat de vorming van anilineglucuronide niet meer geschieden kan. ARIAS (1962) vond, dat leverschijven van Gunn ratten, die geen bilirubine en andere esterglucuronides kunnen vormen, aniline wél konden glucuronideren.

Volgens ISSELBACHER e.m. (1962) zijn de glucuronyltransferases voor ester- en etherglucuronides identiek. Een argument hiervoor is, dat het anthranilzuur de glucuronidering van het p-nitrophenol door een gedeeltelijk gezuiverd enzym competitief remt. Het is evenwel door deze auteurs niet bewezen, dat het anthranilzuur onder deze omstandigheden inderdaad uitsluitend een esterglucuronide vormt. Wijzelf hebben (zie Hoofdstuk VIII) althans geen bilirubineglucuronidering meer kunnen vinden door een gedeeltelijk gezuiverd p-nitrophenolglucuronyltransferase, i.t.t. de bevindingen van ISSELBACHER e.m. (1962). Een „biologische” steun voor onze waarneming is, dat wij hebben gevonden, dat de lever van de volwassen Gunn rat het p-nitrophenol, i.t.t. het bilirubine, op een normale wijze kan glucuronideren. (zie Hoofdstuk VIII). Wij menen, dat het p-nitrophenol glucuronyltransferase en dat van het bilirubine niet identiek zijn.

Verdere zuivering van het enzym zal eerst definitief kunnen uitwijzen of er inderdaad verschillende glucuronyltransferases voor ester-, ether- en N-glucuronides bestaan.

HOOFDSTUK VI

DE GESLACHTSRIJPING VAN DE VROUWELIJKE GUNN RAT

De geslachtssteroiden worden, evenals het bilirubine, in de lever glucuronideerd en/of gesulphateerd, waarna hun uitscheiding plaats vindt.

Het is bekend, dat bij mannelijke patiënten lijdend aan een levercirrhose onder andere gynaecomastie kan ontstaan (zie o.a. SOSKIN, 1950).

Indien de bij de Gunn rat aangetoonde tekort schietende glucuronidering van het bilirubine en verschillende andere stoffen, ook voor de geslachtssteroiden zou gelden, zou men wellicht veranderingen in de normale geslachtelijke verschijnselen van dit dier verwachten kunnen. Dit was voor ons de aanleiding het tijdstip van het optreden van de geslachtsrijping van de vrouwelijke Gunn rat in vergelijking met dat van de normale Wistar rat te onderzoeken.

Wij hebben getracht de omstandigheden, waaronder de waarnemingen gedaan zijn, van zo weinig mogelijk invloed op het verschijnsel van de geslachtsrijping te doen zijn. Het is bekend, dat bij jonge ratten, welke voortdurend aan licht zijn blootgesteld, de geslachtsrijping wordt vervroegd. (o.a. LUCE-CLAUSEN en BROWN, 1939). Daarom is het ons noodzakelijk gebleken het klimaat op een kunstmatige wijze constant te houden. De jongen verbleven met hun moeders vanaf de geboorte in een vertrek dat ondergronds was gelegen. In dit vertrek kon daglicht niet binnendringen. De elektrische verlichting brandde van 7.00—19.00 uur. De temperatuur (25° C) en de vochtigheidsgraad (60—70%) werden middels een terugkoppeling geregeld. De watertoevoer werd op 22-11-1961 verbeterd. De waarnemingen bij de dieren, welke voor dit tijdstip zijn opgegroeid zijn daarom afzonderlijk weergegeven.

De JJ ratten verkregen wij uit onze stam op de volgende wijze: indien een vrouwelijk dier, ingezet met een mannelijke jj rat, in twee of meer normale worpen, geen enkele maal icterische (jj) jongen had geworpen, beschouwden wij dit moederdier als JJ. Wij zijn op deze wijze te werk gaand nimmer verrast in de verdere nakomelingen. Op overeenkomstige wijze werden de ♂ JJ dieren verkregen. Wij beschouwden de jongen van de op deze wijze verkregen mannelijke en vrouwelijke JJ dieren als JJ. Het dient te worden opgemerkt, dat, zelfs al zou zich onder deze dieren ongemerkt toch een enkel Jj dier hebben bevonden, deze omstandigheid alleen maar nivellerend zou werken op het verschil in het tijdstip van het optreden van de vaginaopening, dat tussen JJ en Jj dieren bestaat. (zie verder).

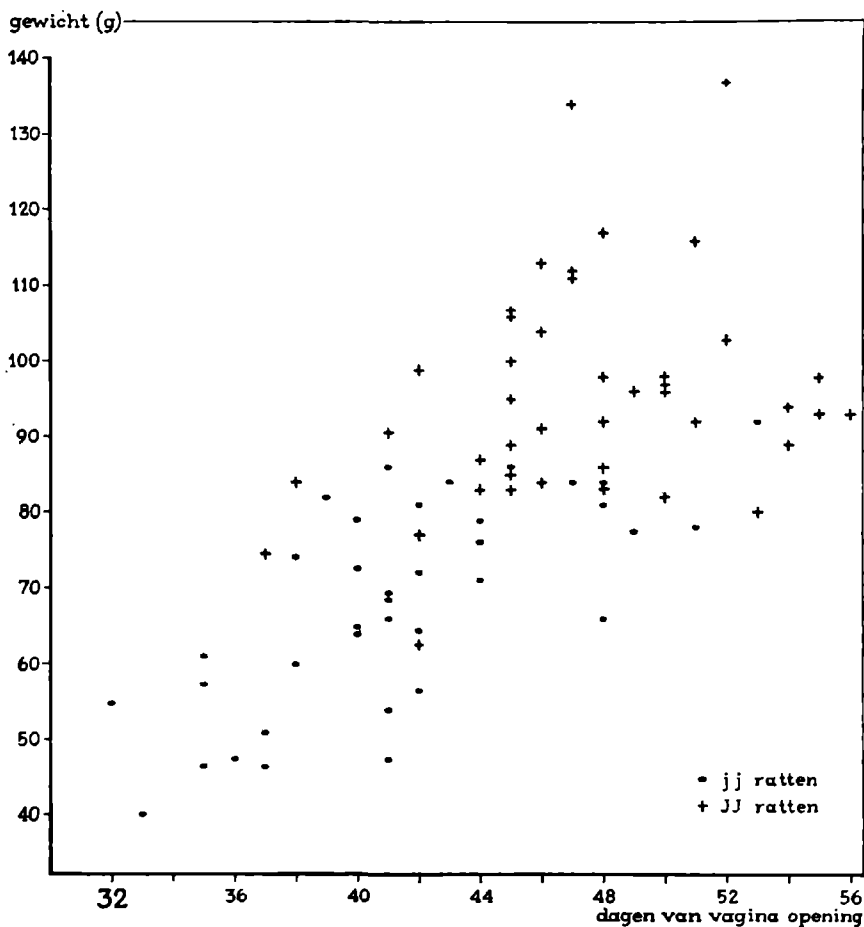
Het optreden van de opening van de vagina werd vanaf de derde levensweek dagelijks gecontroleerd. Indien de vagina twee dagen achtereen geopend was, beschouwden wij de eerste dag per definitie als het moment van de opening van de vagina.

Op het moment van de vaginaopening werden alle dieren gewogen. De gegeven

getallen zijn de gemiddelden met de daarbij behorende standaard fout. De p werd verkregen door toepassen van de test volgens Student.

Resultaten:

1. Het moment van de vaginaopening van de jj dieren, vergeleken, met dat van de JJ dieren (voor verbetering van de watertoevoer), is weergegeven in de puntengrafiek 11 en de tabel 14.



Figuur 11. De levensdag waarop de vagina open ging bij jj dieren en bij JJ dieren (vóór de verbetering van de watertoevoer).

Tabel 14

	JJ	jj	
dag van de vaginaopening	47,4 ± 0,6	41,4 ± 0,8	p < 0,001
gewicht in g. op de dag van de vaginaopening	95,5 ± 2,4	68,1 ± 2,4	p < 0,001
n	42	37	

De vaginaopening van de jj ratten is, onder de gegeven omstandigheden, vervroegd opgetreden. Deze vervroegde geslachtsrijping is niet gepaard gegaan met een versnelde groei, gemeten als toeneming van het lichaamsgewicht.

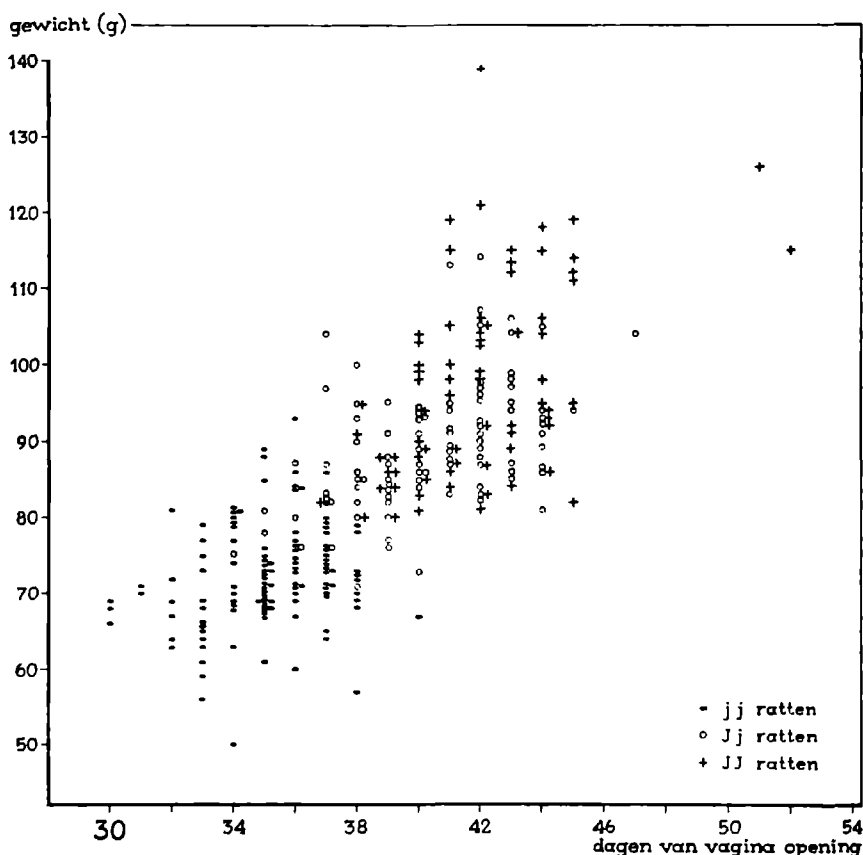
Wij merken op, dat de moeders van de jj dieren Jj waren, en dat de JJ dieren Jj moeders hadden. De mogelijkheid bestaat, dat een factor via de moedermelk naar de jongen overgaat, waardoor de geslachtsrijping wordt versneld. Deze overweging was voor ons een reden, om de vaginaopening van de jj ratten te vergelijken met die van hun Jj zusters (zie verder).

Een eveneens te overwegen mogelijkheid was, dat jj ratten minder gemakkelijk konden drinken dan JJ (en Jj) dieren als gevolg van hun motorische stoornissen. Deze opvatting schijnt steun te vinden in de waarnemingen van GUNN (1944), die vond, dat het gemiddelde lichaamsgewicht van de jj dieren lager was dan van hun Jj nestgenoten. Het tijdstip van de geslachtsrijping wordt door slechtere voeding evenwel eerder vertraagd dan versneld, zodat deze omstandigheden een versterking van onze waarnemingen zouden zijn, als deze uitwezen dat de vaginaopening van de JJ ratten vervroegd zou zijn.

2. De vaginaopening van de jj ratten, vergeleken met die van hun Jj zusters en die van de JJ dieren (na verbetering van de watertoevoer) is weergegeven in de puntengrafiek 12 en de tabel 15.

Tabel 15

	JJ	Jj	jj	
dag van de vaginaopening	41,9 ± 0,3	40,4 ± 0,3	35,1 ± 0,2	JJ t.o.v. Jj: p < 0,001 JJ t.o.v. jj: p < 0,001 Jj t.o.v. jj: p < 0,001
gewicht op de dag van de vaginaopening	97,7 ± 1,5	89,4 ± 0,8	72,3 ± 0,6	JJ t.o.v. Jj: p < 0,001 JJ t.o.v. jj: p < 0,001 Jj t.o.v. jj: p < 0,001
n	72	96	119	



Figuur 12. De levensdag waarop de vagina open ging bij de jj dieren, hun Jj zusters en bij JJ dieren (na de verbetering van de watertoevoer).

De vaginaopening van jj ratten is, onder de beschreven omstandigheden, vervroegd opgetreden, vergeleken met die van de Jj en die van de JJ ratten. De vaginaopening van de Jj ratten is eveneens vervroegd, vergeleken met die van de JJ dieren. De moeders van de Jj en de jj ratten waren dezelfde, namelijk Jj, die van de JJ ratten waren JJ.

De vervroegde vaginaopening is niet gepaard gegaan met een versnelde lichaamsgroei, gemeten aan het gewicht.

Het gevolg van verbetering van de watertoevoer is, dat de vaginaopening van zowel de JJ als van de jj dieren vervroegd werd, terwijl de spreiding van de waarnemingen verminderde.

Verbetering van de watertoevoer is de enige omstandigheid, welke is veranderd tijdens de waarnemingen die zijn vermeld in de figuren 11 en 12. In de tabel 16 zijn de gegevens van de tabel 14 en tabel 15 vergeleken:

Tabel 16

	JJ	jj
de dag van de vaginaopening vóór de verbeterde watertoevoer	$47,4 \pm 0,6$	$41,4 \pm 0,8$
Idem na de verbeterde watertoevoer	$41,9 \pm 0,3$	$35,1 \pm 0,2$
	$p < 0,001$	$p < 0,001$

3. De toestand van de uteri en van de ovaria van de jj ratten werd vervolgens met die van hun even oude Jj zusters en die van even oude JJ ratten vergeleken. Dit geschiedde daags na de vaginaopening van de jj ratten. Alle waarnemingen geschiedden na verbetering van de watertoevoer.

Op het moment van de vaginaopening van de jj ratten bleek de vagina van geen enkel even oud Jj en JJ controle dier geopend, hetgeen de waarnemingen, welke onder 1 en 2 zijn beschreven, nog eens bevestigt.

Groep I 30 JJ ratten, geboren tussen 24-12-'61 en 5-3-'62.
32 jj ratten, geboren tussen 24-12-'61 en 5-3-'62.

Tabel 17

	JJ	jj	
gemiddelde lichaamsgewicht in gr., daags na de vaginaopening van de jj rat	$89 \pm 1,8$	$85 \pm 1,0$	
uterusgewicht in mgr.	$132,8 \pm 11,3$	$186,0 \pm 10,9$	$0,001 < p < 0,01$
gewicht ovaria in mgr.	$70,3 \pm 4,6$	$74,0 \pm 4,1$	$p > 0,05$
n	30	32	

De organen werden gewogen op een torsiebalans.

Groep II 15 Jj ratten, geboren tussen 21- 3 en 31-3-'62.
15 jj ratten, geboren tussen 21-3 en 31-3-'62.

Tabel 18

	Jj	jj	
gemiddeld lichaamsgewicht in gr, daags na de vaginaopening van de jj rat	97 ± 2,1	93 ± 1,5	
uterusgewicht in mgr.	112,1 ± 14,9	165,2 ± 16,5	0,01 < p < 0,05
gewicht ovaria in mgr.	74,6 ± 5,1	78,0 ± 4,1	p > 0,05
n	15	15	

De organen werden in een 10% formoloplossing bewaard. Uit de tabellen 17 en 18 blijkt, dat daags na de vaginaopening van de jj ratten het uterusgewicht van de jj dieren groter is dan dat van hun even oude Jj zusters en van de JJ ratten. De gewichten van de ovaria verschillen niet.

Als men de gewichten van de uterushoorns zou berekenen als percentage van het lichaamsgewicht van het dier, zouden de gevonden verschillen alleen nog maar duidelijker tot uiting zijn gekomen. Het gemiddelde lichaamsgewicht van de JJ en van Jj dieren was immers steeds groter dan dat van de vergeleken jj dieren daags na de vaginaopening van de jj rat.

Bij het histologisch onderzoek bleek, dat er bij 9 van de 15 jj ratten van groep II daags na de vaginaopening corpora lutea aanwezig waren in de ovaria. Bij slechts 1 van de 15 Jj controle dieren van groep II waren er bij het microscopisch onderzoek corpora lutea in de ovaria te zien. In alle ovaria bestond een stimulering van de follikelgroei. De vervroegde opening van de vagina van de jj dieren was dus in 60% der gevallen zeer waarschijnlijk met ovulaties gepaard gegaan, zodat de jj ratten onder deze proefomstandigheden in 60% der gevallen een ovulatoire pubertas praecox hadden en niet slechts een voortdurende bronst.

DONOVAN en VAN DER WERFF TEN BOSCH (1956) vonden, na het aanbrengen van elektrolytische laesies in het voorste deel van de hypothalamus van jonge vrouwelijke ratten op de 14e of 15e levensdag, dat er bij 6 van de 8 geslachtsrijpe gelaedeerde ratten corpora lutea in de ovaria waren. De ovaria van 8 schijngeopereerde ratten bevatten geen corpora lutea. Bij een later onderzoek vond VAN DER WERFF TEN BOSCH (1959), dat de ovulaties na deze ingreep *bemoeilykt* kunnen zijn.

„In de ovaria van 11 van de 17 gelaedeerde ratten werden bij histologisch onderzoek geen corpora lutea gevonden. Deze vondst wijst er op dat er gedurende de laatste tijd van het leven geen ovulaties hebben plaatsgevonden. Drie van deze dieren waren tijdens het leven niet vruchtbaar gebleken, terwijl de vagina-uitstrijkjes tekenen van langdurige bronst hadden doen zien. Twee ratten die bij de dood geen corpora lutea in het ovarium hadden, waren wel vruchtbaar, terwijl zij ook regelmatig cyclische

vaginaveranderingen hadden vertoond. Zeer in het algemeen kan men, vermoedelijk met recht, zeggen, dat bij ongeveer tweederde van de dieren de ovulaties bemoeilijkt zijn na het aanbrengen van de laesies, hoewel een deel van deze dieren toch vruchtbaar zal zijn geweest" (VAN DER WERFF TEN BOSCH, 1959).

Wij hebben de fertiliteit van de jj ratten ingezet met jj mannen vergeleken met die van de Jj ratten ingezet met jj mannen gedurende eenzelfde periode, en vonden de volgende gegevens: tabel 19.

Tabel 19

	Jj	jj	
aantal zwangerschappen	377	220	
n	167	101	
aantal zwangerschappen per dier	2,25	2,17	
niet fertiel	6 (3%)	7 (7%)	X ² -test: p > 0,05
Fertiliteit van jj en Jj ratten, ingezet met jj ♂♂, van 22-11-'61 tot 15-12-'62.			

Onze conclusie is, dat de fertiliteit van de jj dieren niet duidelijk minder is dan die van de Jj dieren. Dit is in tegenstelling tot de bewering van JOHNSON, GARCIA, FIGUEROA en SARMIENTO (1961), die stellen, dat „sterility in the jaundiced male is probably somewhat more common than in the normal or heterozygote animal, but the difference is by no means so striking as in the case of the jaundiced female." Cijfers worden door deze auteurs evenwel niet vermeld.

Bespreking:

Er zijn verschillende factoren welke het begin van de geslachtsrijping van de vrouwelijke rat kunnen beïnvloeden, o.a. licht (LUCE-CLAUSEN en BROWN, 1939), een elektrische prikkeling van de cervix uteri (SWINGLE, SEAY, PERLMUTT, COLLINS, FEDOR en BARLOW, 1951) en het aanbrengen van electrolytische laesies in het voorste gedeelte van de hypothalamus (DONOVAN en VAN DER WERFF TEN BOSCH, 1956; VAN DER WERFF TEN BOSCH, 1959). Al deze invloeden zouden via het centrale zenuwstelsel inwerken. Men neemt aan, dat de electrolytische laesies de remmende werking opheffen, welke onder de normale omstandigheden van het voorste gedeelte van de hypothalamus op de gonadotrope werking uitgaat.

Het ligt dus voor de hand om het optreden van de ovulatoire pubertas

praecox van de Gunn ratten te verklaren door een beïnvloeding van de activiteit van dit remcentrum.

De factor, welke men op het eerste gezicht hiervoor verantwoordelijk zou stellen is het bilirubine. Wij hebben evenwel de in de literatuur beschreven ophoping van het bilirubine in bepaalde hersenkernen in onze rattenstam niet kunnen vinden (zie Hoofdstuk III): van de 9e tot de 21e dag was slechts een lichtgeel waas over de hersenen van de Gunn ratten te zien. De vervroegde vagina opening van de Jj dieren vergeleken met die van de JJ ratten is eveneens moeilijk te rijmen met de opvatting, dat binnendringen van bilirubine in de hersenen er de oorzaak van is. Het serum van de Jj ratten is kleurloos. Wij konden in het serum geen bilirubine aantonen. Zoals reeds is vermeld mag men niet met absolute zekerheid aannemen, dat de Jj ratten niet door een factor in de moedermelk een eerdere vagina opening hebben dan de JJ ratten, omdat de moeders van de Jj en de JJ dieren resp. Jj en JJ zijn. Het is echter zeker dat het binnendringen van het bilirubine in bepaalde hersenkernen niet de oorzaak kan zijn van het verschil tussen de Jj en de JJ dieren.

Wij hebben de veronderstelling, dat het bilirubine niet de stof is, welke de vervroeging van de geslachtsrijping veroorzaakt nog op de volgende wijze getoetst: bij vrouwelijke jj ratten werd op de 11e en de 14e levensdag 1 mg. bilirubine en bij vrouwelijke nestgenoten het oplosmiddel van het bilirubine intraperitoneaal ingespoten. Wij vonden (tabel 20), dat de vaginaopening van de jj ratten, welke met het bilirubine waren ingespoten niet eerder was opgetreden dan bij de jj nestgenoten.

Tabel 20

jj ratten	2 mg. bilirubine i.p.	controledieren	
dag van de vagina opening	$35,9 \pm 0,4$	$36,0 \pm 0,3$	$p > 0,05$
n	11	7	

De mogelijkheid bestaat theoretisch dat tegelijk met de mutatie jj een mutatie pp is ontstaan, welke ovulatoire pubertas praecox veroorzaakt; j en p zouden dan, volgens onze waarnemingen zeer nauw gecorreleerd moeten zijn, zo nauw dat de factor voor het tekort aan bilirubineglucuronyltransferase en die voor de vervroegde gonadotrope werking op nagenoeg dezelfde locus op een der chromosomen verondersteld moeten worden.

Een andere mogelijkheid ter verklaring van de vervroegde geslachtsrijping van zowel de jj als de JJ ratten schuilt in de bevindingen, dat de homozygote Gunn ratten in hun lever, nieren, mucosa van maag en duodenum en subcorticale hersenen o-aminophenol, 4-methylumbelliferon, o-aminobenzoaat en bilirubine niet glucuronideren. De hetero-

zygote ratten kunnen dit wel, maar in verminderde mate (ARIAS, 1959b; ARIAS, JOHNSON en WOLFSON, 1960). SCHMID (1960) vond, dat de glucuronidering van o-aminobenzoaat door heterozygote Gunn ratten in vivo was verminderd, vergeleken met normale ratten, maar was vermeerderd, vergeleken met homozygote Gunn ratten. De normale ratten kunnen al deze genoemde stoffen op een normale wijze glucuronideren. Wil men geen afzonderlijke factoren voor het tekort aan glucuronyltransferase en voor een vervroegde geslachtsrijping aannemen dan is er wellicht plaats voor de veronderstelling, dat een tekort aan een bepaald glucuronyltransferase in het subcorticale hersenweefsel op enigerlei wijze het hypothalamische remcentrum zodanig beïnvloedt, dat een vervroegde verhoging van de hypofysaire gonadotrope werking ontstaat, met het optreden van ovulatoire pubertas praecox als gevolg.

Samenvatting

De vrouwelijke homozygote Gunn ratten zijn eerder geslachtsrijp dan hun heterozygote zusters. Deze vervroegde geslachtsrijping ging in 60 % der gevallen met ovulaties gepaard. De heterozygote ratten zijn eerder geslachtsrijp dan normale vrouwelijke ratten. Ophoping van bilirubine in bepaalde hersenkernen is *niet* de oorzaak van deze vervroegde geslachtsrijping. De homozygote Gunn ratten kunnen, blijkens literatuuronderzoek, in hun lever, nieren, mucosa van maag en duodenum en subcorticale hersenweefsel o-aminophenol, 4-methylumbelliferon, o-aminobenzoaat en bilirubine niet glucuronideren. De heterozygote ratten kunnen dit wel, maar in verminderde mate. De normale ratten kunnen de genoemde stoffen op een normale wijze glucuronideren. Wil men geen afzonderlijke factoren voor het tekort aan glucuronyltransferase en voor een vervroegde geslachtsrijping aannemen, dan is er wellicht plaats voor de veronderstelling, dat een tekort aan een bepaald glucuronyltransferase in het subcorticale hersenweefsel op enigerlei wijze het hypothalamische remcentrum zodanig beïnvloedt, dat een vervroegde verhoging van de hypofysaire gonadotrope werking ontstaat, met het optreden van ovulatoire pubertas praecox als een gevolg.

DE INVLOED VAN DE OPLOSMIDDELEN VAN BEPAALTE GESLACHTSSTEROIDEN OP DE SERUM-BILIRUBINECONCENTRATIE VAN DE GUNN RAT

Onze oorspronkelijke opzet was na te gaan of de homozygote Gunn rat het oestron en het progesteron anders metaboliseert dan de normale Wistar rat uit dezelfde kolonie.

Het is in dit verband belangwekkend er op te wijzen, dat DE SNOO (zie KLOOSTERMAN, 1947) hoge doses menformon aan kinderen lijdend aan ernstige icterus neonatorum toegediend heeft. Dit menformon zal zeer waarschijnlijk oestron, benzylalcohol en oleum arachidis bevat hebben. Uit het vervolg zal blijken welke betekenis aan deze therapie toegekend moet worden.

Bij onze eerste proeven bleek, dat er een grote sterfte optrad onder de jonge Gunn ratten na het onderhuids toedienen van oestron, opgelost in olie. Deze dieren kregen eerst neurologische afwijkingen (ataxie en stuipen) en stierven daarna. Wij hadden de indruk, dat de huid en de oren van de dieren sterker icterisch werden. Een bacteriële oorzaak van deze sterfte was onwaarschijnlijk, daar er bij het bacteriologisch onderzoek van de ingespoten oplossingen geen pathogene microörganismen aantoonbaar waren.

De mogelijkheid, dat de „olie” waarin het oestron was opgelost de beschreven verschijnselen veroorzaakt zou hebben, werd als volgt getoetst (deze „olie” bevatte 10% benzylalcohol en 90% oleum arachidis): 28 vrouwelijke en 38 mannelijke Gunn ratten kregen in groepen onderhuids toegediend (figuur 14):

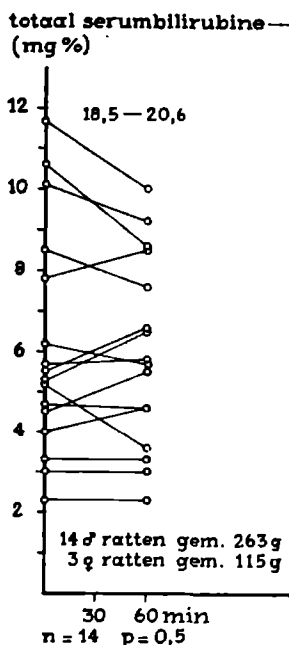
- A: 6,25 γ oestron in 0,5 ml. benzylalcohol-oleum arachidis (10:90 v/v)
- B: 0,5 ml. benzylalcohol-oleum arachidis (10:90 v/v)
- C: 6,25 γ oestron in 0,5 ml. alcohol-phys.zout (13:87 v/v)
- D: 0,5 ml. oleum arachidis
- E: 1 ml. benzylalcohol-water (4:96 v/v).

Dezelfde stoffen werden aan 46, 3-4-weken tevoren gecastreerde, vrouwelijke homozygote Gunn ratten toegediend (zie figuur 14). Deze ratten waren gecastreerd om onafhankelijk te zijn van een mogelijke invloed van de cyclus.

Er werd 0,5 ml. bloed afgenomen voor de naar MALLOY en EVELYN (1937) gewijzigde bepaling van het totale serumbilirubine. Dit afnemen van bloed geschiedde door hart-

punctie onder aethernarcose, onmiddellijk vóór en 60 minuten na de onderhuidse inspuiting van de stoffen. De bepaling van het bilirubine*) geschiedde binnen 3 uur na het afnemen van het bloed.

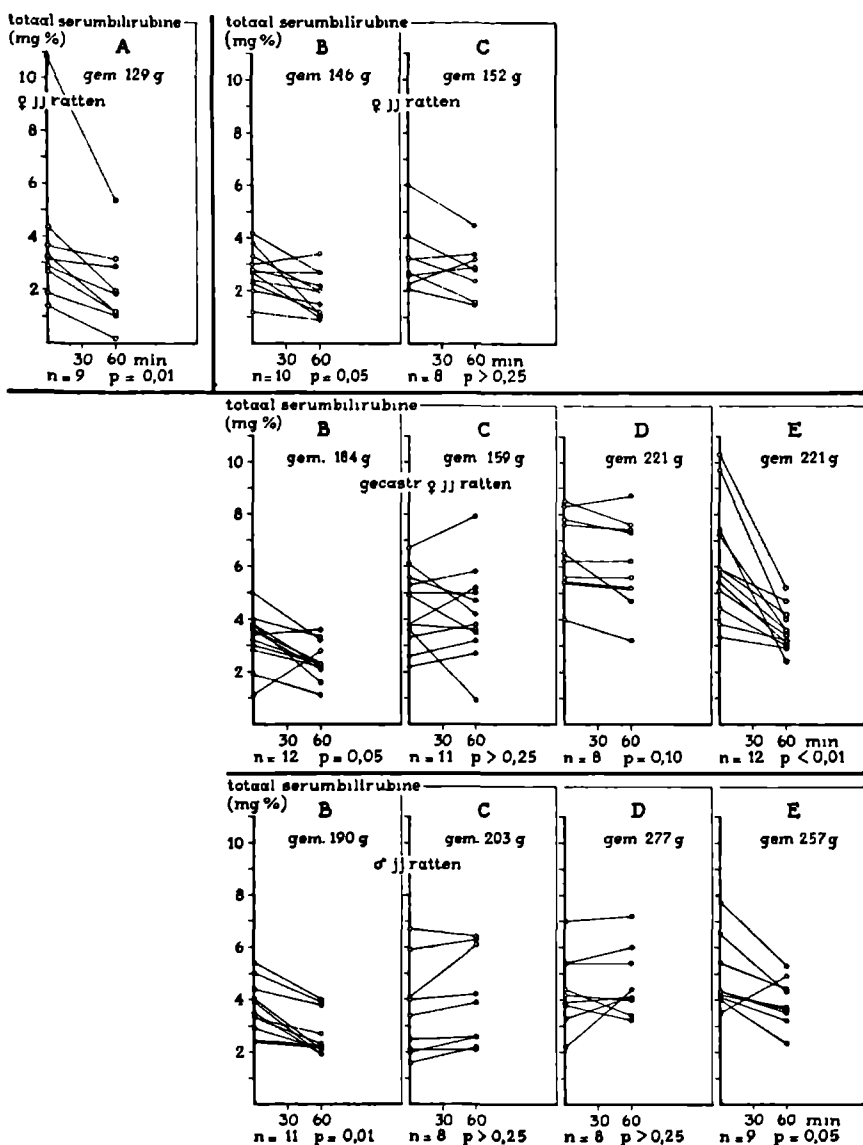
Uit de figuur 13 blijkt, dat men onder de gegeven omstandigheden de nulhypothese mag aannemen, dat, indien de ratten niets kregen ingespoten, na 60' de kans, dat het serumbilirubine verlaagd is, 0,5 bedraagt. Telkens werd de Dixon en Mood test toegepast.



Figuur 13: Indien aan tijdens de bloedafneming onder aethernarcose verkerende jj ratten geen onderhuidse inspuiting wordt toegediend, is de kans 0,5, dat het serumbilirubine na 60' onder de omstandigheden van onze proeven daalt.

Uit de figuur 14 kan men aflezen, dat het benzylalcohol in de „olie” de stof is, welke verantwoordelijk is voor een daling van het serumbilirubinegehalte.

*) deze bilirubinebepalingen werden verricht door mej. L. Kock, analyste, waarvoor wij onze erkentelijkheid willen betuigen. De biotechnici P. Spaan, J. Reitsma en de laboratorium-bediende P. Janssen verleenden technische medewerking, waarvoor onze dank.



Figuur 14: Onderhuidse inspuiting bij JJ ratten van:

A: 6,25 γ oestron in 0,5 ml. benzylalcohol-oleum arachidis (10:90 v/v).

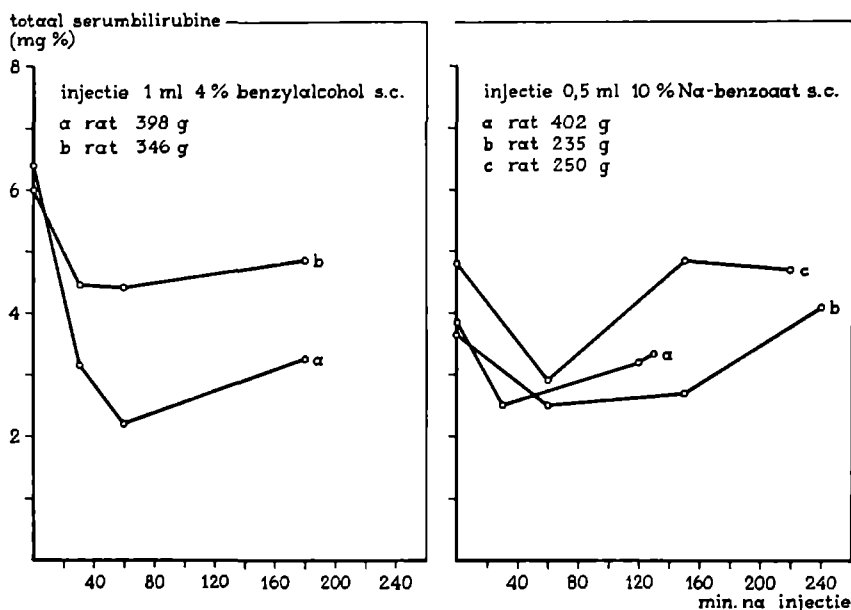
B: 0,5 ml. benzylalcohol-oleum arachidis (10:90 v/v).

C: 6,25 γ oestron in 0,5 ml. alcohol-phys. zout (13:87 v/v).

D: 0,5 ml. oleum arachidis.

E: 1 ml. benzylalcohol-water (4:96 v/v).

Uit de figuur 15 blijkt, dat de daling van het serumbilirubinegehalte onder de invloed van het onderhuids ingespoten benzylalcohol (a) onder onze proefomstandigheden na 60' maximaal is.



Figuur 15: Na 60' is onder de omstandigheden van onze proefnemingen de daling van het serumbilirubinegehalte onder de invloed van het onderhuids ingespoten benzylalcohol maximaal (a). Hetzelfde geldt voor het Na-benzoaat (b).

Het benzylalcohol wordt in het lichaam in benzoaat omgezet (SCHEMIDEBERG, 1881; SNAPPER, GRÜNBAUM en STURKOP, 1924; zie ook WILLIAMS, 1949 en ARTZ en OSMAN, 1950). Dit was voor ons de reden om het Na-benzoaat te onderzoeken (figuur 15b en figuur 16A). Hieruit blijkt, dat het Na-benzoaat dezelfde werking heeft als het benzylalcohol.

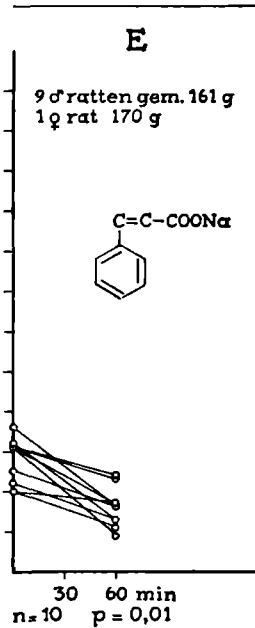
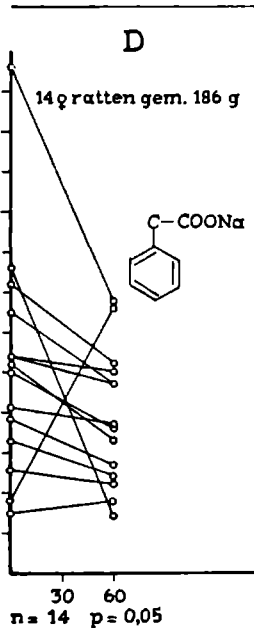
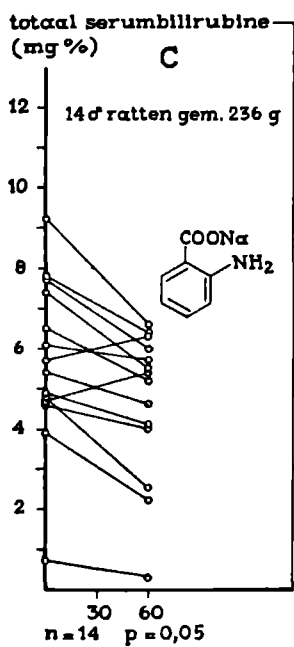
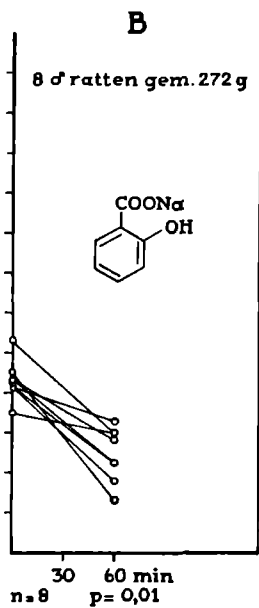
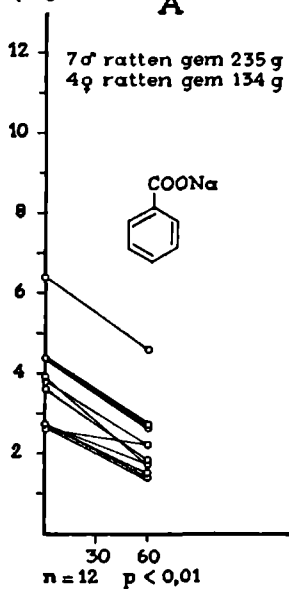
Figuur 16: de invloed van onderhuidse toediening van 0.5 ml. 10%:

- A: Na-benzoaat
- B: Na-salicylaat
- C: Na-anthranilaat
- D: Na-phenylacetaat
- E: Na-kaneelzuur.

op het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat.

Alle ingespoten oplossingen werden zonodig vóór de inspuiting op pH 7,0 gebracht.

totaal serumbilirubine
(mg %)



Uit figuur 16 blijkt, dat ook het Na-salicylaat (B), het Na-anthranilaat (C), het Na-phenylacetaat (D), en het Na-kaneelzuur (E) een werking hebben, die met die van het Na-benzoeaat (A) overeen komt. De bevindingen bij het Na-salicylaat zijn in overeenstemming met die van JOHNSON e.m. (1961).

[illegible]

Ook na onderhuidse inspuiting van 0,5 ml. 8% phenol in aq. dest. veranderde het serumbilirubinegehalte van 4 Gunn ratten (200 gram) niet. De ratten raakten in alge-

mene kramptoestand. Bij 2 normale Wistar ratten (200 gram) ontstonden onder dezelfde omstandigheden veel sterker krampen. De krampen ontstonden na 5 minuten, en waren na 15 minuten verdwenen.

Samenvatting: onder de omstandigheden van onze proefnemingen werd het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat verlaagd door benzyl-alcohol, Na-benzooat, Na-phenylacetaat, Na-kaneelzuur, Na-anthranilaat en Na-salicylaat. Phenol, penicillamine-HCl, „Davitamon K” en vitamine K₁ hadden deze werking niet.

Verklaring:

In de tabel 21 zijn een aantal uit de literatuur bekende stoffen vermeld, waarvan bekend is, dat zij de serumbilirubineconcentratie van de Gunn rat kunnen verlagen. Deze stoffen zijn gerangschikt naar mogelijke oorzaak van hun werking.

LESTER, HAMMAKER en SCHMID (1962) bereikten bij Gunn ratten een daling van het serumbilirubinegehalte door het per os toedienen van cholestyramine hars. Het ongeconjugerd bilirubine wordt waarschijnlijk in de darm aan het hars gebonden. Het hars wordt niet geresorbeerd.

ODELL (1959) veronderstelde, dat slechts het niet aan het albumine gebonden bilirubine intracellulair kan geraken. Hij toonde aan, dat de albumine-bilirubine binding werd verzwakt in het serum van kinderen met erythroblastosis foetalis en in een mengsel van runder-albumine en bilirubine door het toevoegen van hematine, sulfonamides, Na-salicylaat, cafeïne-Na-benzooat (een mengsel van cafeïne en Na-benzooat) en een toenemende [H⁺]. Het vrije bilirubine was *als zodanig* in vitro dialyseerbaar. ODELL (1959) ging bij zijn experimenten uit van de waarneming van MARTIN (1949), dat de top van het absorptiespectrum van het albumine-bilirubine complex bij 460 m μ ligt, en die van het niet aan het albumine gebonden bilirubine bij 420-440 m μ .

Eigen onderzoek:

Wij hebben getracht de veronderstelling te toetsen, dat de in vivo gevonden daling van het serumbilirubinegehalte wordt verklaard door het losmaken van het bilirubine uit de binding met het albumine.

1. Bij papierelectrophorese van het serum van een mannelijke volwassen jf rat werd vóór de kleuring de plaats van het gele pigment (bilirubine) aangegeven. Het bilirubine bleek zich inderdaad op de plaats van het albumine te bevinden.

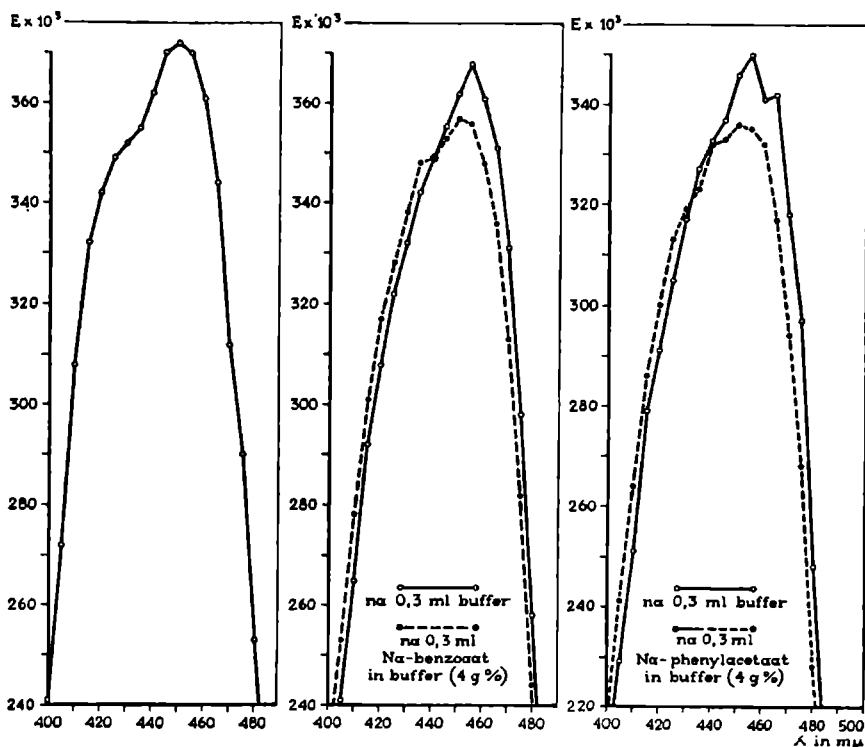
2. Het absorptiespectrum van het serum van een volwassen mannelijke Gunn rat, dat 15x in 0,1 M fosphaatbuffer (pH 7,5) is verdund, vertoont een duidelijke top bij 460 m μ (figuur 18a). Waarschijnlijk verkeert het bij de Gunn rat aan het albumine gebonden bilirubine in

Tabel 21

A. Bewezen verdringing van het bilirubine uit het albumine complex in vitro	B. Waarschijnlijk als A, maar niet bewezen	C. Zeker niet als A	D. Onbekend
Na-salicylaat*) Na-sulfisoxazol*) Na-sulfadiazine*) β-hydroxyboterzuur (JOHNSON e.m., 1961)	sulfadimethoxine*) tolbutamide acetazolamide penicilline-G chloramphenicol Na-benzoaat Na-p-hippuraat katoenzaadolie Na-oleaat	anthranilzuur (JOHNSON e.m. 1961)	Tetracycline Na-glucronaat glucose epinephrine heparine bij nuchtere dieren

Stoffen, welke na parenterale toediening het serumbilirubine van Gunn ratten verlagen. (JOHNSON, GARCIA, FIGUEROA en SARMIENTO, 1961); de met *) gemerkte stoffen zouden volgens JOHNSON e.m. (1961) de frequentie van de neurologische stoornissen verhogen bij dieren welke jonger zijn dan 3 weken.

evenwicht met zich in het serum bevindend bilirubine, dat niet aan het albumine is gekoppeld, aangezien zich ook een top bij 420-440 m μ bevindt.



Figuur 18: a. absorptiespectrum van het serum van een Gunn rat.
 b. absorptiespectrum van een albumine-bilirubine model, na toevoegen van Na-benzoaat.
 c. als b) na toevoegen van Na-phenylacetaat.

De omstandigheden bij het bepalen van de absorptiespectra in een albumine bilirubine model werden, sterk gewijzigd, ontleend aan de methodiek van ODELL (1959); er werd namelijk o.a. bijzondere aandacht besteed aan het gebufferd zijn van de oplossingen, en er werd gebruik gemaakt van *menselijk* serumalbumine.

1. het albumine-bilirubine model werd gemaakt als volgt: bij 0,3 ml. 20% *humaan serumalbumine* (125 ml. bevatte 25 gram albumine, 0,02 mol Na-amygdalaat, 0,02 mol Na-caprylaat, het totaal Na was 350 mg.%) werd 0,13 ml. *bilirubineoplossing* gevoegd (12 mg. bilirubine (British Drug House) in 0,7 ml. 0,25 N Na OH + 0,1 ml. 0,1 N HCl + 2 ml. H₂O), en met 0,1 M fosfaatbuffer (pH 7,5) tot 100 ml. aangelengd.

2. oplossing van de te testen stof: 4 gr.% in 0,1 M fosfaatbuffer (pH 7,5).

Gemeten werd: a. 2,5 ml. albumine-bilirubine oplossing + 0,3 ml. isotonische fosfaatbuffer t.o.v. isotonische fosfaatbuffer.

b. 2,5 ml. albumine-bilirubineoplossing + 0,3 ml. oplossing van de te testen stof t.o.v. isotonische fosfaatbuffer.

Er werd gemeten in een Unicam spectrophotometer, Sp 500; de optische weglengte van de cuvet was 1 cm.

Het bleek nu, dat de top van het absorptiespectrum van het albumine-bilirubine complex ($460\text{ m}\mu$) daalde onder de invloed van het Na-benzoesaat, terwijl tevens een stijging in het gebied van $420\text{--}440\text{ m}\mu$ leek op te treden. Hetzelfde kon worden aangetoond voor het Na-phenylacetaat. (figuur 18 b en c). Het benzylalcohol zelf was onder deze omstandigheden niet in staat om het bilirubine uit de albumine binding los te maken.

Een stof (penicillamine-HCl), welke in vivo geen daling van het serumbilirubinegehalte veroorzaakte, bleek in vitro geen daling van de top van het absorptiespectrum bij $460\text{ m}\mu$ te geven.

Men mag de situatie in vitro (een gesloten systeem, waaruit het vrije bilirubine niet kan verdwijnen) niet zonder meer vergelijken met hetgeen zich in vivo afspeelt (het waarschijnlijk ontstane vrije bilirubine kan door de vaatwand heen naar het weefsel gaan).

Het is bekend, dat

- primaire aromatische alcoholen
- esters van primaire aromatische alcoholen
- phenyl- β -hydroxyzuren (uitzondering: amandelzuur)
- phenyl- β -ketozuren

en — onvertakte phenylalkylcarbonzuren

in het lichaam tot benzoëzuur of phenylazijnzuur worden geoxydeerd, afhankelijk van de lengte van hun zijketen (zie o.a. WILLIAMS, 1949).

Men mag waarschijnlijk aannemen, dat de genoemde stoffen, voorzover zij zelf niet reeds een verdringende werking hebben t.o.v. het bilirubine op het albumine-bilirubinecomplex, na hun afbraak tot benzoëzuur, resp. phenylazijnzuur, de serumbilirubinespiegel van de Gunn rat kunnen doen dalen. Een voorbeeld van een stof, welke niet zelf in vitro het bilirubine uit de binding aan het albumine losmaakt, maar dit eerst in vivo na omzetting in Na-benzoesaat doet, is waarschijnlijk het benzylalcohol zelf. Wij veronderstellen, dat de in vivo gevonden daling van het serumbilirubinegehalte kan worden verklaard door het losmaken van het bilirubine uit de binding met het albumine.

Men kan zich afvragen of de benzeenkern voor het beschreven verschijnsel een conditio sine qua non is, of dat zelfs alle verbindingen met een *carboxylgroep* in beginsel het beschreven verschijnsel vertonen. Dit laatste is o.i. mogelijk, aangezien JOHNSON, GARCIA, FIGUEROA en SARMIENTO (1961) vermelden, dat het β -hydroxyboterzuur in vitro het bilirubine uit de binding met het albumine losmaakt. De aanwezigheid van een benzeenkern zal het effect hoogstwaarschijnlijk versterken.

Een ander probleem, dat buiten het bestek van de invloed van de oplosmiddelen van de geslachtssteroiden valt, is het vraagstuk, of de verbindingen met meer dan één benzeenring of meer dan één carboxylgroep het beschreven verschijnsel in sterker mate

vertonen. Mogelijk is hierbij ook in het spel de afstand tussen de verschillende COOH-groepen en/of benzeenringen.

Samenvatting: Benzylalcohol, Na-benzoaat, Na-phenylacetaat, Na-kaneelzuur, Na-anthranilaat en Na-salicylaat veroorzaken na onderhuidse toediening aan homozygote Gunn ratten een voorbijgaande daling van de serumbilirubineconcentratie. „Davitam K”, „Konakion” en penicillamine beïnvloeden het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat niet. Uit de verandering van het absorptiespectrum van een albumine bilirubine model bleek, dat Na-benzoaat en Na-phenylacetaat bilirubine uit de binding met albumine losmaken. Het aldus ontstane vrije bilirubine kan door de vaatwand heen gaan (ODELL, 1959). Op grond van aan de literatuur ontleende gegevens moet men aannemen, dat

- primaire aromatische alcoholen
- esters van primaire aromatische alcoholen
- phenyl- β -hydroxyzuren (uitzondering: amandelzuur)
- phenyl- β -ketozuren

en — onvertakte phenylalkylcarbonzuren
in benzoëzuur of phenylazijnzuur worden omgezet, afhankelijk van de lengte van hun zijketen. Voorzover deze stoffen niet zelf reeds een verdringing van bilirubine uit de binding aan albumine bewerkstelligen, zullen zij dit waarschijnlijk doen na hun omzetting in benzoëzuur, respectievelijk phenylazijnzuur.

Deze vondst lijkt consequenties te hebben voor het toedienen van geneesmiddelen aan kinderen met icterus neonatorum.

HOOFDSTUK VIII

DE INVLOED VAN DE NATUURLIJKE EN KUNSTMATIGE GESLACHTSSTEROÏDEN OP DE LEVERFUNCTIE VAN DE GUNN RAT

Aangezien vele steroïden uitgescheiden worden na voorafgegane glucuronidering hebben wij nagegaan of de Gunn rat de geslachtssteroïden anders metaboliseert dan de normale Wistar rat. Bij dit onderzoek stootten wij op het vraagstuk van de invloed van de oplosmiddelen van onderhuids toegediende geslachtssteroïden op de bilirubine-stofwisseling van de Gunn rat (Hoofdstuk VII). Om toch de invloed van de geslachtssteroïden zelf op de stofwisseling van het bilirubine aan een onderzoek te kunnen onderwerpen, hebben wij deze geslachtssteroïden per os toegediend in een indifferente opvulmiddel.

De farmacologie van de progestatieve stoffen, de ovulatieremmers en verwante steroïden is tot op heden voornamelijk beperkt geweest tot het aantonen van mogelijke androgene bijwerkingen. Het is evenwel niet waarschijnlijk, dat de invloed van deze steroïden slechts tot de hypofyse en mogelijk ook het ovarium en de uterus beperkt blijft. Het moet daarom nuttig geacht worden na te gaan of deze steroïden wellicht ook een meer algemene nevenwerking hebben. Een aanduiding van zo een algemene werking is de zogenaamde „steroïd-icterus”. Deze wordt blijkbaar veroorzaakt door de remming van de uitscheiding van het geconjugeerd bilirubine vanuit de levercel in de gal.

ARIAS (1962) heeft deze remming onderzocht door een experimenteel onderzoek bij ratten: hoge doses 17-methyltestosteron, 17-ethyl-19-nortestosteron en andere anabole steroïden veroorzaakten een remming van de uitscheiding van het geconjugeerde bilirubine vanuit de levercel in de gal. Cortison, hydrocortison en testosteron veroorzaakten deze remming niet.

Wij hebben twee voorbeelden gevonden van de invloed van de natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden op de leverfunctie (VAN LEUSDEN, 1962), namelijk enerzijds een remming in vitro van een glucuronyltransferase door bepaalde geslachtssteroïden en anderzijds een invloed van de geslachtssteroïden in vivo op de leverfunctie van de Gunn rat.

A. *In vitro** onderzoeken

Voor onze *in vitro* experimenten maakten wij o.a. gebruik van een gedeeltelijk gezuiverd glucuronyltransferase. Dit glucuronyltransferase werd bereid volgens ISSELBACHER, CHABRAS en QUINN (1962).

100 gram konijnenlever werd in een „Atomix” gehomogeniseerd (gedurende 1 minuut) in 3 vol. ijskoude KCl (0,1M). Het aldus verkregen homogenaat werd 20' in een „Lourdes” centrifuge bij 15.000 x g gecentrifugeerd, om de kernen en de mitochondriën te doen neerslaan. Vervolgens werd het supernatant 60' in een „Spinco” ultracentrifuge bij 105.000 x g gecentrifugeerd, teneinde de „microsomen” te doen neerslaan. Deze microsomen werden gewassen met ijskoude KCl (0,1 M) en in KCl (0,1 M) tot $\frac{1}{3}$ van het oorspronkelijk volume lever geresuspenseerd. Deze suspensie werd met 0,5 M Tris buffer op pH 9,0 gebracht. Aan deze suspensie werd 60 mg gelyophiliseerd gif van de slang *Trimeresurus flavoviridis* toegevoegd, nadat dit gif eerst was opgelost in 3 ml. 0,05 M Trisbuffer (pH 7,4) en was gekookt. (Deze slang werd verzorgd en „gemolken” op het Centraal Dierenlaboratorium; het gif van *TRIMERESURUS OKINAWENSIS**) bleek dezelfde werking bij onze proeven te bezitten als dat van *TRIMERESURUS FLAVOVIDIS*). Vervolgens werd de aldus bewerkte suspensie gedurende 16 uur bij 4° C geïncubeerd. Daarna werd de suspensie op pH 7,4 gebracht met 1N HCl en in een „Spinco” ultracentrifuge gedurende 120' gecentrifugeerd bij 105.000 x g. Alle bewerkingen geschieden bij 0–4° C. De op deze wijze verkregen bovenstaande vloeistof behield na lyophiliseren zijn activiteit gedurende enige maanden, indien bij –20° C. bewaard.

1. De eigenschappen van het gedeeltelijk gezuiverd glucuronyltransferase.

In dit „venom treated supernatant” vonden ISSELBACHER e.m. (1962), dat de *p*-nitrophenol glucuronidering $\pm 4x$ was toegenomen. Dit enzym bezit niet het vermogen om aniline te glucuronideren. Volgens ISSELBACHER e.m. (1962) bezit dit enzym wel glucuronyltransferase werking ten opzichte van het bilirubine, zij het niet meer dan 3% van de *p*-nitrophenol glucuronyltransferase activiteit.

Wijzelf vonden na de bovenbeschreven bewerking evenwel, dat weliswaar het vermogen om *p*-nitrophenol te glucuronideren na behandeling met slangengif was toegenomen, maar het vermogen om bilirubine te glucuronideren afwezig was. (tabel 22).

Voor elke bepaling werden levermicrosomen van één konijn gebruikt. De glucuronidering werd gemeten als volgt:

Het meten van de glucuronidering van het *p*-nitrophenol: in het reactiemengsel

* Voor de hulp bij deze *in vitro* experimenten, geboden door de heer J. A. J. M. Bakkeren, chem. drs., en mej. E. Hirdes, analyste, willen wij onze erkentelijkheid betuigen. Kristallijn norethisteron was een gift van „Schering”; 1–4 saccharolacton was een gift van „Pfizer”; de firma „Organon” schonk ons het kristallijn pregnandiol, progesteron, oestron, oestradiol, oestriol, lynestrenol en methylnortestosteron, waarvoor wij gaarne onze dank uitspreken.

*) Deze slangen werden ons toegezonden door bemiddeling van Dr. Ahkira Ohsaka, Dept. of Bacteriology, University of Tokyo, Tokyo, Japan, waarvoor wij onze erkentelijkheid betuigen.

Tabel 22

Na behandeling met het slangengif is het vermogen om het p-nitrophenol te glucuronideren toegenomen, maar de bilirubine glucuronyl-transferase activiteit is verdwenen.

	μmol p-nitrophenolglucuronide gevormd per mg.N. per 30'		μmol bilirubine-glucuronide gevormd per mg.N per 30'	
Bepaling	levermicrosomen vóór de behandeling met het slangengif	supernatant na de inwerking van het gif	vóór	na
1	0,129	0,614	0,014	0.000
2	0,782	2,115	0,020	0.000
3	0,196	0,783	0,011	0.000
4	0,834	1,579	0,028	0.000
5	0,372	0,961	0,015	0.000
6	0,747	2,200	0,019	0.000

was aanwezig: 0,15 μ mol p-nitrophenol
 0,06 μ mol UDPGA (Sigma Chemical Co.)
 26 μ mol Trisbuffer, pH 7,4
 1 μ mol 1,4-saccharolacton (om het mogelijk aanwezige β -glucuronidase te remmen)
 0,03 ml. microsomen suspensie of enzymoplossing.
 Totaal volume: 0,305 ml.

Het mengsel werd gedurende 30 minuten geïncubeerd in een waterbad van 37° C onder voortdurend schudden. De reactie werd gestopt door het toevoegen van 0,6 ml. ethanol. Vervolgens werd gedurende 20 minuten afgecentrifugeerd. Van het bovenstaande werd 0,6 ml. afgepipetteerd en aan 0,03 ml. 10 N KOH toegevoegd. De extinctie werd gemeten bij 400 m μ *). De controlebuisjes bevatten alle stoffen behalve het UDPGA. Er werd gemeten t.o.v. een blanco, zonder p-nitrophenol. Alle bepalingen geschieden in duplo. Deze bepaling berust op het feit, dat het p-nitrophenol een extinctie bij 400 m μ heeft, welke na glucuronideren verdwijnt.

Het meten van het *bilirubine*, dat werd geglucuronideerd geschiedde als volgt: het bilirubine (British Drug House) werd opgelost: 12 mg. bilirubine in 0,75 ml. 0,25 N NaOH + 1,4 ml. serum (van een mannelijk persoon) + 0,3 ml. 0,5 N HCl + 0,4 ml. 0,25 N NaOH. In het reactiemengsel bevonden zich:

0,108 μ mol. bilirubine
 0,06 μ mol UDPGA
 26 μ mol Tris (pH 7,4)
 1 μ mol 1,4-saccharolacton
 0,03 ml. microsomen suspensie, of enzymoplossing.

De concentratie van het serum in het mengsel was 23 vol.%. De bilirubineconcent-

*) gemeten werd in een „Unicam” spectrophotometer, Sp 500. Optische weglengte van de cuvet: 0,3 cm.

tratie was 20 mg.%. Het mengsel werd 30 minuten geïncubeerd in een waterbad van 37° C, onder voortdurend schudden. De controlebuisjes bevatten alle stoffen, behalve het UDPGA. Na het toevoegen van 0,7 ml. water werd onmiddellijk na afloop van de reactie het direct bilirubine bepaald volgens LATHE en WALKER (1957). Er werd toegevoegd: 0,5 ml. diazo reagens [dit werd telkens vers bereid uit 0,3 ml. 0,5% Na NO₂ + 10 ml. sulfanilzuur (bereid door 500 mg. sulfanilzuur aan 1,5 ml. geconcentreerde HCl toe te voegen en met water tot 100 ml. aan te vullen)]. Na 5' wachten werd 0,1 ml. 5% ascorbinezuur toegevoegd. Na weer 5' wachten werden toegevoegd: 0,1 ml. verzadigd (NH₄)₂ SO₄ en 3,0 ml. ethanol. De buisjes werden vervolgens gedurende 15' bij -20° C bewaard en bij 525 m μ gemeten. Er werd gemeten ten opzichte van een blanco zonder bilirubine. Alle bepalingen geschieden in duplo. Deze bepaling berust op het feit, dat de toeneming van de extinctie bij 525 m μ onder deze proefomstandigheden berust op de toeneming van het direct bilirubine. Onder deze experimentele omstandigheden is de aldus gemeten toeneming van het direct bilirubine veroorzaakt door het bilirubineglucuronide, omdat de enige stof, welke deze toeneming kan hebben veroorzaakt het UDPGA is. De hoeveelheid eiwit, welke in de microsomen of enzymoplossing aanwezig was, werd bepaald volgens LOWRY, ROSEBROUGH, FARR en RANDALL (1951).

Men zou, naar aanleiding van de inhoud van Tabel 22 kunnen opwerpen, dat wellicht de aard van de test de oorzaak was van het feit, dat het gedeeltelijk gezuiverde enzym het bilirubine niet meer glucuronideert. (Het bilirubine wordt in de test aangeboden, gebonden aan serumalbumine). Daarom hebben wij ook de mogelijke bilirubine glucuronidering door het gedeeltelijk gezuiverde enzym getest, door het bilirubine in alcohol opgelost aan te bieden, in de plaats van aan serum gebonden. Ook onder deze omstandigheden bleek door dit glucuronyltransferase geen direct bilirubine te worden gevormd.

Nog een mogelijkheid is, dat het bilirubine glucuronyltransferase bij de behandeling met het slangengif in de microsomen was achtergebleven, terwijl het p-nitrophenol glucuronyltransferase in oplossing was gegaan.

Bij herhaling bleek er na de behandeling met het slangengif geen bilirubineglucuronidering aantoonbaar in de microsomen.

Ook was bij herhaling geen glucuronidering van het bilirubine aantoonbaar in de bovenstaande vloeistof of in de microsomen, wanneer het slangengif in de plaats van 16 uur 2 uur had ingewerkt. Het p-nitrophenol glucuronyltransferase was onder deze omstandigheden wel in oplossing gegaan.

Werd in de plaats van de normale hoeveelheid slangengif $1/_{10}$ of $1/_{100}$ van de hoeveelheid genomen, dan ging ongeveer $1/_{10}$, respectievelijk ongeveer $1/_{100}$ van de hoeveelheid p-nitrophenolglucuronyltransferase in oplossing, maar er was na de gifbehandeling noch in de microsomen, noch in de verschillende bovenstaande vloeistoffen glucuronyltransferase activiteit ten opzichte van het bilirubine aantoonbaar.

Onze waarnemingen wijzen, in tegenstelling tot de bevindingen van ISSELBACHER e.m. (1962), niet in de richting van een identiek zijn van het bilirubine glucuronyltransferase met het op deze wijze verkregen p-nitrophenol glucuronyltransferase.

2. De remming van de glucuronidering van het p-nitrophenol door de natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden.

De gegevens, welke betrekking hebben op de remming van de glucuronidering van het p-nitrophenol door diverse steroïden, zijn vermeld in de tabel 23.

De glucuronidering van het p-nitrophenol werd gemeten op de wijze als op blz. 56 aangegeven. Gebruikt werden verschillende enzym oplossingen na onderwerping aan behandeling met slangengif; 0,150 μ mol steroid werd toegevoegd in 0,010 ml. propyleenglycol of 0,010 ml. alcohol tenzij anders is vermeld. De controlebuisjes met en zonder alcoholtoevoeging, respectievelijk propyleenglycoltoevoeging, gaven geen extinctionsverschillen.

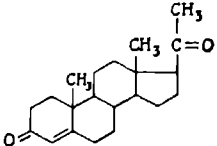
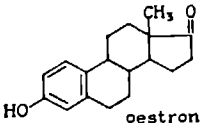
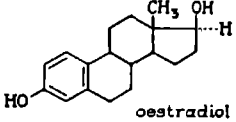
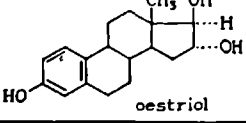
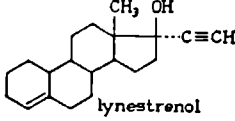
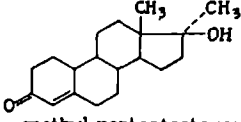
Opgemerkt dient te worden, dat men de remmende werking door de diverse steroïden niet zonder meer onderling mag vergelijken, omdat

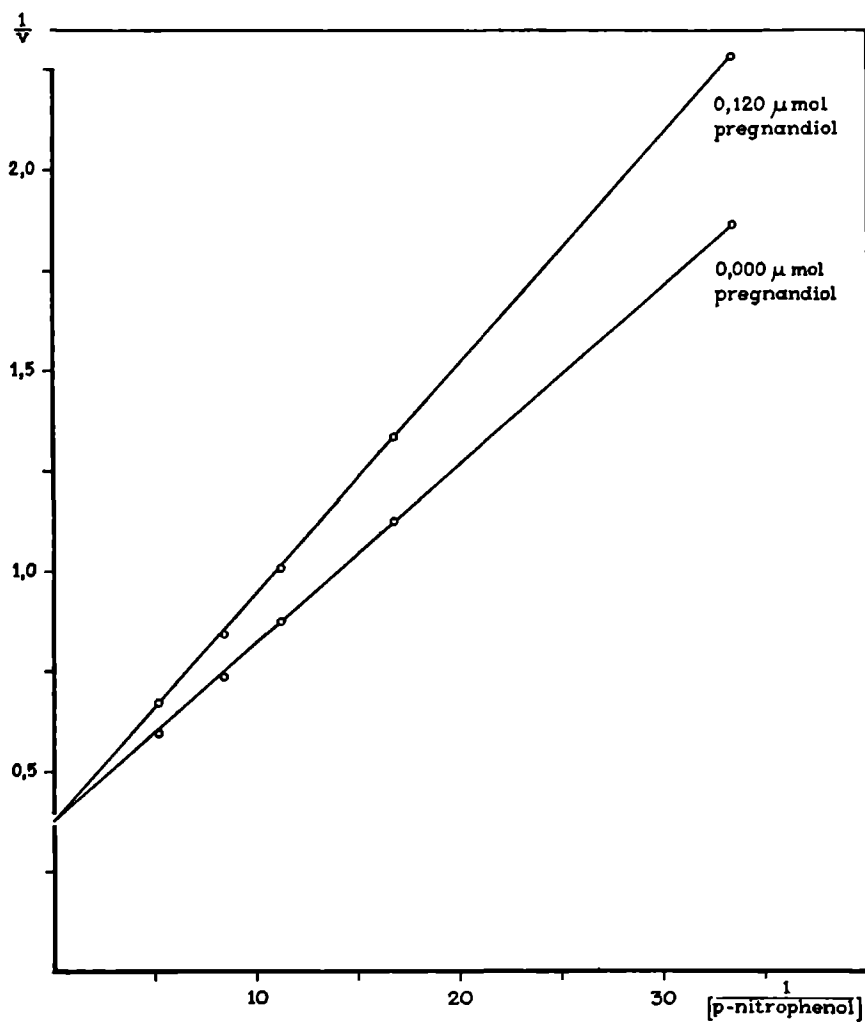
1. het oplossen van de verschillende steroïden eerst na langer of korter verwarmen in een waterbad (80° C) gelukte, waarbij de structuur van de steroïden kan hebben geleden.
2. bij sommige experimenten werd propyleenglycol, bij andere alcohol (een enkele maal het dubbele volume) toegevoegd.
3. er werden voor de diverse steroïden en soms voor hetzelfde steroïd verschillende gedeeltelijk gezuiverde enzym oplossingen gebruikt. Deze hadden een verschillende activiteit ten opzichte van het p-nitrophenol.

Toen het pregnandiol de glucuronidering van het p-nitrophenol bleek te remmen, rees de vraag over het al dan niet competitieve karakter van deze remming. In de aanwezigheid van 0,320 μ mol UDPGA (overmaat) en in de al of niet aanwezigheid van 0,120 μ mol pregnandiol (in alcohol) werden de volgende waarnemingen gedaan (grafiek 19).

Tabel 23

Remming van de glucuronidering van het p-nitrophenol door de natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroiden.

μmol p-nitrophenolglucuronide gevormd per mg. N. per 30'			
zonder steroïde	i.a.v. steroïde	Opm.	
 progesteron	0,210 0,428	0,138 0,216	propyleenglycol "
 oestron	0,378 0,292	0,197 0,153	0,150 μmol in 0,02 ml. alcohol
 oestradiol	0,378 0,435 0,292	0,303 0,269 0,212	alcohol propyleenglycol "
 oestriol	0,445 0,449	0,310 0,290	alcohol "
 lynestrenol	0,250 0,325 0,289	0,140 0,197 0,171	propyleenglycol " "
 methyl nortestosteron	0,242 0,215	0,141 0,155	" "



Grafiek 19: Lineweaver-Burk (1934) plot, waaruit kan worden besloten dat het pregnandiol de glucuronidering van het p-nitrophenol competitief remt. (De tests werden verricht met een gedeeltelijk gezuiverd glucuronyltransferase)

Onze conclusie is, dat onder de gegeven omstandigheden het glucuronyltransferase van het p-nitrophenol identiek is met dat van het pregnandiol.

Tabel 25

De literatuurgegevens betreffende de remming van de glucuronidering van de verschillende aglyconen onder de verschillende omstandigheden door steroïden. Cursief is: remming; niet cursief is: geen remming.

Lever

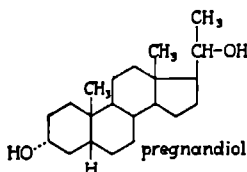
	<i>Ratten</i>			<i>Caviae</i>		<i>Konijnen en Apen</i>
aglycon	schijven	homogenaten	microsomen	homogenaten	microsomen	schijven
Bilirubine	<i>pregnanolon,</i> <i>progesteron,</i> <i>desoxycorti-</i> <i>costeron,</i> <i>aetiocholanolon,</i> <i>pregnandiol,</i> <i>testosteron</i> <i>androsteron</i> <i>cortison, cortisol</i> <i>oestrogenen</i> (LATHE en WALKER, 1958b)	al deze steroïden geen remming in homogenaten (LATHE en WALKER, 1958b) <i>Progesteron</i> HSIA e.m. (1960)	<i>Progesteron</i> HSIA e.m. (1960)	<i>Progesteron</i> HSIA e.m. (1960)	<i>Progesteron</i> HSIA e.m. (1960)	<i>pregnanolon, progesteron,</i> <i>desoxycorticosteron,</i> <i>aetiocholanolon,</i> <i>testosteron,</i> <i>pregnandiol, cortison,</i> <i>androsteron, oestrogenen</i> <i>cortisol,</i> (LATHE en WALKER 1958)
o-aminophenol		<i>pregnandiol-3α, 20α;</i> <i>allopregnan-</i> <i>triol, en preg-</i> <i>nanolon</i> (HSIA e.m., 1960)			<i>pregnandiol-</i> <i>glucuronide;</i> <i>17α-ethyl-</i> <i>19-nortesto-</i> <i>steron; preg-</i> <i>nandiol;</i> <i>testosteron;</i> <i>cholesterol</i> <i>pregnandion,</i> <i>pregnenolon</i> <i>17α-hydroxy-</i> <i>progesteron,</i> <i>cortison,</i> <i>oestradiol,</i> <i>oestron,</i> <i>progesteron</i> (DOWBEN en HSIA 1962)	
P-nitrophenol					<i>pregnandiol-</i> <i>glucuronide,</i> <i>pregnandiol,</i> <i>testosteron,</i> <i>17α-ethyl-19-</i> <i>nortestosteron,</i> <i>cholesterol</i> <i>pregnandion,</i> <i>pregnenolon,</i> <i>17α-hydroxy-</i> <i>progesteron,</i> <i>cortison,</i> <i>oestradiol,</i> <i>oestron,</i> <i>progesteron</i> (DOWBEN en HSIA 1962)	

3. De remming van de glucuronidering van bilirubine door pregnandiol.

Pregnandiol bleek eveneens de glucuronidering van bilirubine te remmen, als de laatst genoemde glucuronidering in de microsomen van de lever van het konijn werd bepaald (Tabel 24).

Tabel 24

Remming van de glucuronidering van het bilirubine door het pregnandiol.



μ mol bilirubineglucuronide per mg. N. per 30'	
zonder steroïde	in aanwezigheid van O, 120 μ mol pregnandiol
0,012	0,006
0,014	0,008

Deze door ons gebruikte bepaling van het direct bilirubine is evenwel niet zo reproduceerbaar (zie o.a. LATHE en RUTHVEN, 1958), dat een LINEWEAVER-BURK (1934) grafiek kon worden gemaakt. Wij zijn dus niet in staat een uitspraak te doen over het al dan niet competitieve karakter van de remming van de bilirubineglucuronidering door pregnandiol.

Bespreking: In de tabel 25 zijn de tegenstrijdige literatuur gegevens samengevat, betreffende de remming van de glucuronidering van de verschillende aglyconen onder de verschillende omstandigheden door steroïden.

Met het gedeeltelijk gezuiverde enzym, dat ons ter beschikking stond, hebben wij dus kunnen aantonen, dat de glucuronidering van het p-nitrophenol wordt geremd door oestron, oestradiol, oestriol, progesteron, pregnandiol, lynestrenol en methylnortestosteron. Het pregnandiol bleek onder de gegeven omstandigheden het p-nitrophenol zelfs competitief te remmen. Het pregnandiol bleek eveneens de glucuronidering van het bilirubine in de levermicrosomen te remmen.

4. De aard van het tekort aan glucuronyltransferase van de Gunn rat.

De bevindingen van SCHMID, HAMMAKER, ROSENTHAL en SWARM (1957), dat de Gunn rat geen glucuronyltransferase werking ten opzichte van

het bilirubine heeft konden wij bevestigen met de levermicrosomen van de Gunn rat.

ARIAS (1961) vond, dat de leverschijven van de Gunn rat het aniline op een normale wijze glucuronideren.

Wij vonden (VAN LEUSDEN, BAKKEREN, ZILLIKEN en STOLTE, 1962), dat de levermicrosomen van de volwassen Gunn rat ongeveer dezelfde glucuronyltransferasewerking hebben ten opzichte van het p-nitrophenol als de levermicrosomen van de normale Wistar rat (tabel 26).

Dat deze bevinding reeel was, werd bewezen, door na 30' niet met ethanol de reactie te stoppen, maar β -glucuronidase toe te voegen en opnieuw 30' te incuberen. Vergeleken met controle experimenten bleek de gele kleur onder de invloed van het β -glucuronidase wederom teruggekeerd.

Tabel 26

μ mol p-nitrophenolglucuronide per mg N per 30' gevormd	
JJ ratten (3 mnd.)	JJ ratten (3 mnd.)
0,030	0,068
0,022	0,043
0,034	0,027
0,048	0,030
	0,047

De levermicrosomen van de volwassen mannelijke Gunn rat glucuronideren het p-nitrophenol even goed als die van de normale Wistar rat.

Wij vonden, dat in de leverhomogenaten van *pasgeboren* JJ ratten de glucuronidering van het p-nitrophenol was verlaagd, vergeleken met *pasgeboren* JJ ratten. De laatste ratten bleken het p-nitrophenol even goed te kunnen glucuronideren als de volwassen dieren. Wij kunnen deze vondst niet verklaren.

De levermicrosomen van de volwassen Gunn rat bevatten dus p-nitrophenol glucuronyltransferase.

Bespreking:

De consequentie van deze bevinding is belangrijk, aangezien het p-nitrophenol glucuronyltransferase identiek lijkt te zijn met dat van het pregnandiol en wellicht ook met dat van verwante geslachtssteroiden. Met andere woorden: deze geslachtssteroiden worden door de Gunn rat op *volwassen leeftijd* waarschijnlijk normaal geglucuronideerd.

Bovendien is het feit, dat de volwassen Gunn rat het p-nitrophenol normaal glucuronideert, een „biologische” steun voor hetgeen door ons

in vitro werd gevonden bij de gedeeltelijke zuivering van een glucuronyltransferase: dit gezuiverd enzym bleek immers p-nitrophenol zeer goed, maar bilirubine in het geheel niet meer te glucuronideren. (Tabel 22).

B. In vivo onderzoeken

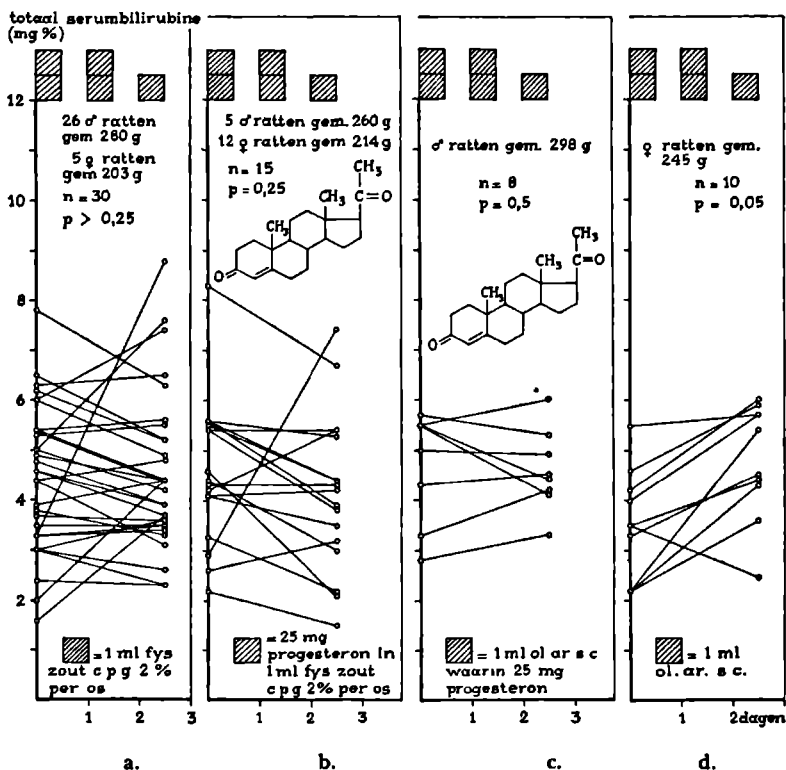
Aangezien de serumbilirubineconcentratie van de volwassen Gunn rat constant blijft, moet de volwassen Gunn rat een uitweg voor de uitscheiding van het bilirubine hebben.

Wordt het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat door het per os toedienen van een aantal natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden beïnvloed?

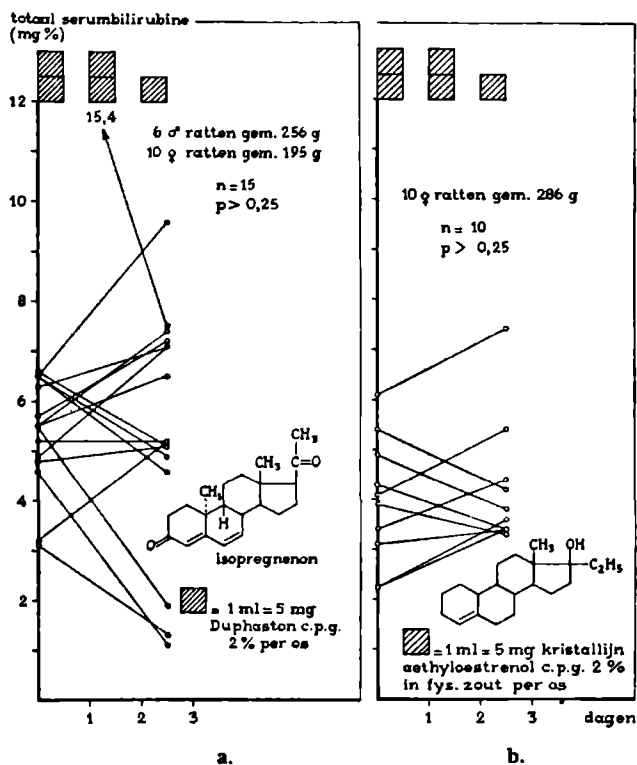
Er werd 0,5 ml. bloed*) afgenomen voor de bepaling van het totale serumbilirubine, gewijzigd naar MALLOY en EVELYN (1937). Dit afnemen van het bloed geschiedde door hartpunctie onder aethernarcose. De bepaling van het bilirubine geschiedde binnen 3 uur na het afnemen van het bloed. Uit de figuur 20a blijkt, dat men onder de gegeven omstandigheden de nulhypothese mag aannemen, dat, na het in 2½ dag per os toedienen van 5 ml. fysiologisch zout c.p.g. 2%, de kans, dat het serumbilirubine verlaagd is, 0,5 bedraagt. Telkens werd de Dixon en Moon test toegepast.

Tijdens de experimenten bleef het lichaamsgewicht van de ratten onveranderd.

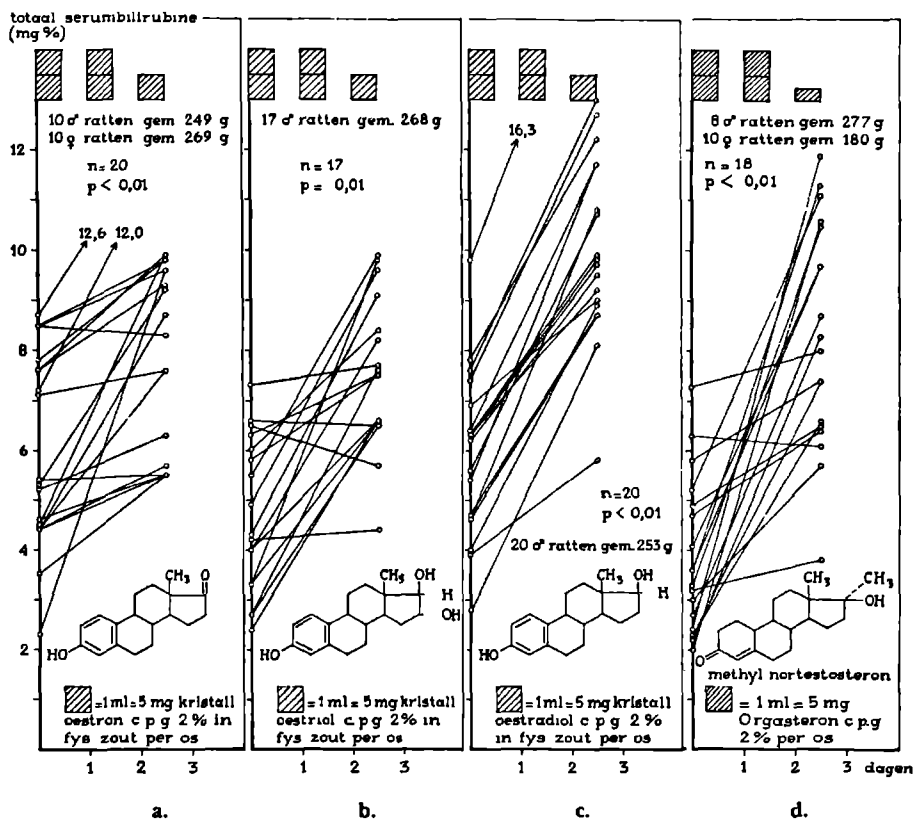
*) Voor de technische hulp van de biotechnici P. Spaan en J. Reitsma en de laboratoriumbediende P. Janssen willen wij onze erkentelijkheid betuigen. Deze bilirubinebepalingen werden verricht door de analystes mej. I. Geerdink en mej. I. Spee, waarvoor onze hartelijke dank.



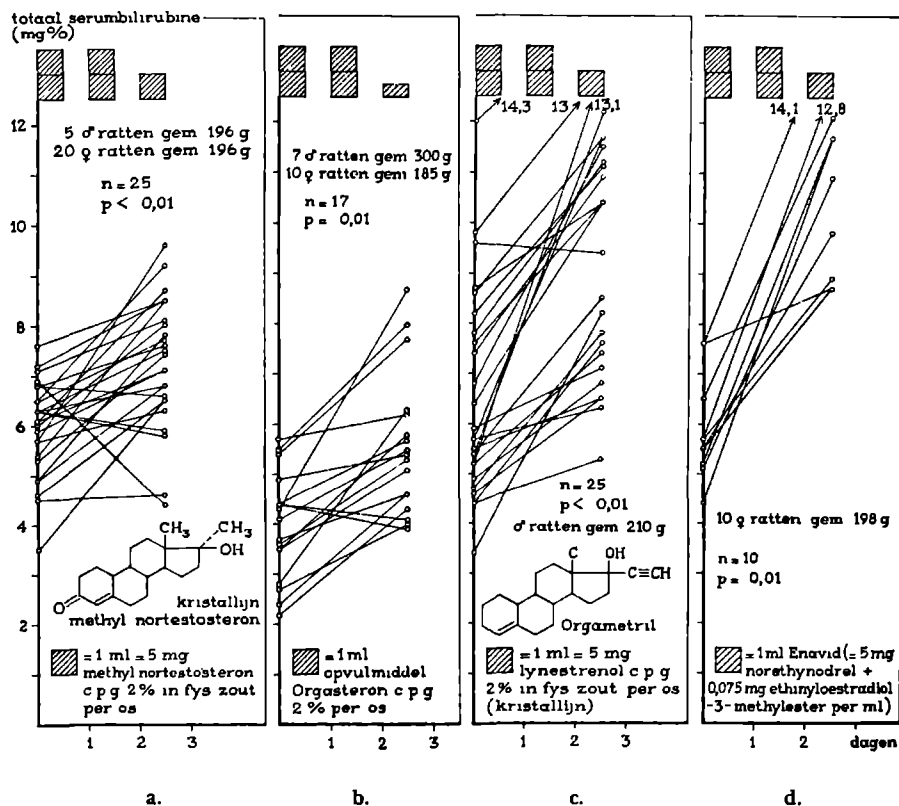
Figuur 20: Het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat verandert niet na fysiologisch zout met pulvis gummosus per os (a), progesteron per os (b), progesteron onderhuids (c) en oleum arachidis onderhuids (d).



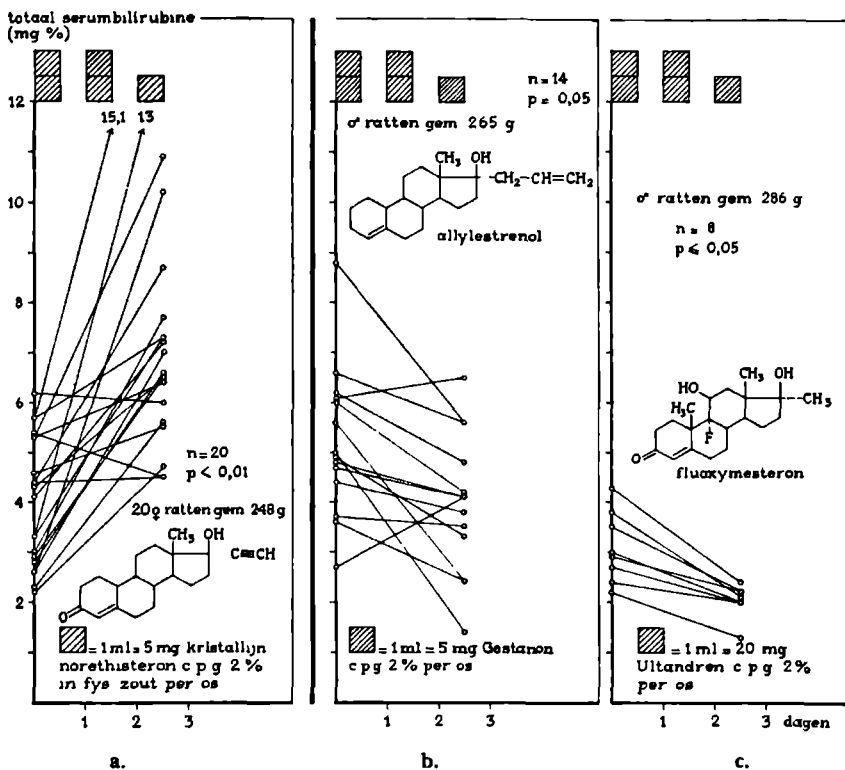
Figuur 21: Het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat verandert niet na het toedienen van „Duphaston” (isopregnenon) (a) en aethyloestrenol (b) per os. Aethyloestrenol is de kristallijne stof uit het „Orgabolin”.



Figuur 22: Het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat stijgt na het toedienen van oestron (a), oestriol (b), oestradiol (c), en „Orgasteron“ tabletten (d) per os.



Figuur 23: Het serum bilirubinegehalte van de Gunn rat stijgt na het toedienen van methylnortestosteron (a), het opvulmiddel van „Orgasteron” (b), kristallijn lynestrenol (c) en „Enavid”-tabletten (d) per os



Figuur 24: Het serum bilirubinegehalte van de Gunn rat stijgt na het toedienen van norethisteron per os (a), doch daalt na het toedienen van „Gestanon” (b) en „Ultandren” (c).

Samenvatting van de experimenten in vivo.

De uitkomsten van de experimenten, welke in de figuren 20 tot en met 24 zijn weergegeven, hebben wij in èèn tabel samengevat (Tabel 27).

Tabel 27

De invloed van de natuurlijke en kunstmatige steroïden op de hyperbilirubinaemie van de Gunn rat.

Geen stijging veroorzaakten:							
gr.	n	p	Naam	tabletten	kristall.	route	dosis
275	30	>0,25	phys. zout c.p.g. 2%			or.	5 ml.
225	15	>0,50	progesteron c.p.g. 2%		+	or.	125 mg.
298	8	0,50	prog. in ol. arachidis		+	s.c.	125 mg.
228	15	>0,25	Duphaston (isopregnenon)	+		or.	25 mg.
286	10	>0,25	Orgabolin (aethyloestrenol)		+	or.	25 mg.
Een daling werd veroorzaakt door:							
265	14	0,05	Gestanon (allylestrenol)	+		or.	25 mg.
286	8	<0,05	Ultandren (fluoxymesteron)	+		or.	100 mg.
Een stijging werd veroorzaakt door:							
259	20	<0,01	oestron		+	or.	25 mg.
253	20	<0,01	oestradiol		+	or.	25 mg.
268	17	0,01	oestriol		+	or.	25 mg.
250	17	0,01	„inactive substances” in Orgasteron tabletten			or.	5 ml. (1 ml. = 1 tablet)
196	25	0,01	methylnortestosteron		+	or.	25 mg.
210	25	<0,01	lynestrenol		+	or.	25 mg.
248	20	<0,01	norethisteron		+	or.	25 mg.
198	10	0,01	Enavid (norethynodrel en ethynyloestradiol- 3-methylester)	+		or.	25 mg.

Opgemerkt dient te worden, dat JJ ratten en Jj ratten geen icterisch serum kregen na het toedienen van zeer hoge doses lynestrenol.

Het bleek mogelijk op grond van deze gegevens een poging tot uitspraak te doen over de voorwaarden waaraan de structuurformule van een geslachtssteroïde moet voldoen om de hyperbilirubinaemie te versterken. Men zou kunnen stellen, dat primair die stoffen, welke een oestrogene werking hebben, d.w.z. een phenolische A ring bezitten, het serumbilirubinegehalte doen stijgen. Als men uitgaat van het duidelijk effect van toegediende oestrogenen kan men ter verklaring van het effect van andere

steroiden aanvoeren dat er argumenten zijn, om aan te nemen dat vele zogenaamde mannelijke steroiden in het lichaam, althans gedeeltelijk, in oestrogenen worden omgezet. Een moeilijkheid die voorlopig niet opgelost lijkt te kunnen worden is dan evenwel dat de stof die als moederstof voor het overgrote gedeelte van de natuurlijke steroiden wordt beschouwd, het progesteron, geen invloed op het bilirubinegehalte te zien gaf. Stilboestrol, dat wat de chemische structuur betreft aanzienlijk verschilt van de steroiden, bleek geen stijging van het bilirubinegehalte van Gunn ratten te veroorzaken ($n = 10$, $p > 0,25$, dosis 25 mg).

ELECTRONEN MICROSCOPISCH ONDERZOEK*) VAN DE LEVERS VAN RAT-TEN WELKE MET STEROÏDEN WARFN BELAST

Na het toedienen van „Orgasteron” tabletten waren er aanwijzingen van vetopho-pingen te zien in de leverparenchymcellen. De „pericanalicular dense bodies” hadden een duidelijk veranderde morfologie, vergeleken met die van een onbehandelde Gunn rat. Tevens was het endoplasmatisch reticulum gedilateerd. In de mitochondria waren geen afwijkingen te zien. De galcapillairen hadden een normaal aspect zonder een vermindering van microvilli. Indien Gunn ratten niet met steroiden waren belast, was minder granulaire endoplasmatisch reticulum aanwezig dan in de levers van nor-male (JJ) ratten.

C. Conclusies (figuur 25)

Uit onze experimenten lijkt te volgen dat pregnandiol, progesteron, oestron, oestradiol, oestriol, lynestrenol en methylnortestosteron de vorming van het p-nitrophenol glucuronide remmen (indien hierbij een gedeeltelijk gezuiverd glucuronyltransferase gebruikt wordt). Het pregnandiol remde competitief en deze bevinding zou er op kunnen duiden, dat het p-nitrophenol glucuronyltransferase, met dat van pregnandiol (en wellicht zelfs met dat van verwante steroiden, welke als glucuronides worden uitgescheiden) identiek is.

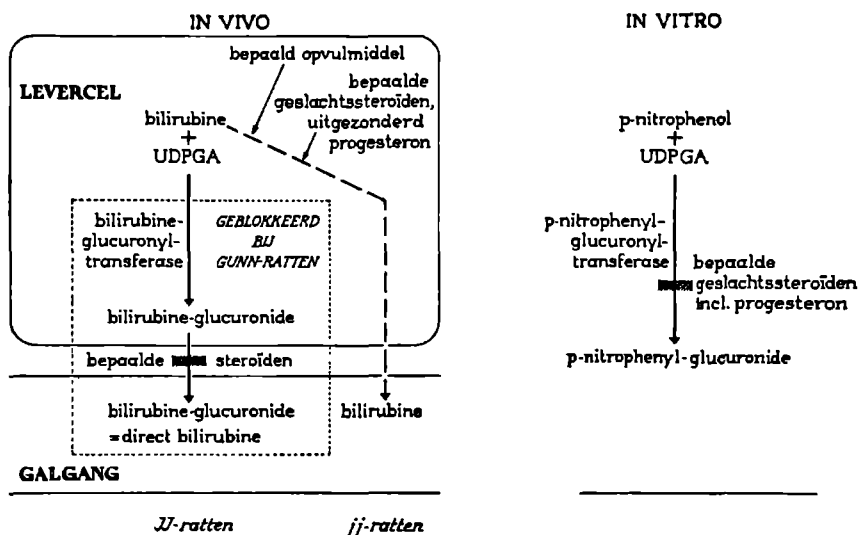
Oestron, oestradiol, oestriol, methylnortestosteron, lynestrenol, nore-thisteron en de zogenaamde „indifferente” opvulmiddelen in de „Or-gasteron” tabletten schijnen de uitscheiding van het bilirubine te remmen, wanneer het bilirubine glucuronyltransferase afwezig is. Deze invloed wordt niet uitgeoefend door het progesteron, het isopregnenon en het aethyloestrenol.

Men kan zich afvragen, of men uit deze vondst ook klinische gevolgtrekkingen mag maken. Op de eerste plaats willen wij er op wijzen, dat de doses waarin deze steroiden hun invloed op de leverfunctie doen gelden zeer hoog zijn. Op de tweede plaats is het syndroom, dat geheel met dat van de Gunn rat vergelijkbaar is (het Crigler-Najjar syndroom) een zeldzaam voorkomende aandoening.

De menselijke pasgeborene heeft een voorbijgaand tekort aan bili-rubine glucuronyltransferase. Dit tekort is verantwoordelijk voor de hyperbilirubinaemie, welke in de eerste levensdagen kan optreden,

*) Verricht door Drs A. M. Stadhouders, afd. Electronenmicroscopie, waarvoor onze bijzondere dank.

vooral bij vroeggeborenen. Wanneer men een behandeling met steroïden wil instellen, is het verstandig om voor ogen te houden, dat het mogelijk lijkt, de zich ontwikkelende leverfunctie te beïnvloeden.



Figuur 25. Samenvatting van de invloed van de natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden op de leverfunctie. De blokkering van de uitscheiding van het geconjugeerde bilirubine uit de levercel in de gal werd door ARIAS beschreven.

In de figuur is niet aangegeven, dat het pregnandiol bovendien nog het bilirubineglucuronyltransferase remt. (Tabel 24, blz. 61).

BESPRAKING

Wij zijn, zoals in de inleiding is aangegeven, bij ons onderzoek aanvankelijk uitgegaan van de vraag, of het tekort aan bilirubine glucuronyltransferase bij de pasgeborene niet mede te wijten is aan een moederlijke factor, met name een remming door de verhoogde aanwezigheid van progestogene steroïden in het moederlijk plasma. De negatieve uitkomsten van LATHE en WALKER (1958b), die werkten met homogenaten, stonden tegenover de positieve van HSIA, DOWBEN, SHAW en GROSSMAN (1960). Wij konden aan de proeven van HSIA e.m. (1960) steun verlenen door aan te tonen, dat pregnandiol de glucuronidering van bilirubine in *levermicrosomen* remt. De onnauwkeurigheid van de bilirubine bepaling (naar HIJMANS VAN DEN BERGH) maakte het onmogelijk tot een proefopstelling te komen, waaruit de al dan niet competitieve aard van deze remming af te lezen was. Dit was wel het geval ten aanzien van de remming van de glucuronidering van het p-nitrophenol door pregnandiol. De aangetoonde competitie van beide stoffen voor hetzelfde glucuronyltransferase betekent, dat het pregnandiol glucuronyltransferase identiek is met het p-nitrophenol glucuronyltransferase. Wij konden verder aantonen, dat het p-nitrophenol glucuronyltransferase niet met dat van bilirubine identiek is. De vraag doet zich voor, of het p-nitrophenol glucuronyltransferase identiek is met dat van de oestrogenen, gezien de in beide moleculen voorkomende phenolische groep. Merkwaardigerwijs evenwel blijkt de ongeboorte oestrogenen te conjugereren, met name het oestriolglucuronide is in grote hoeveelheid in het meconium aanwezig (zie DICZFALUSY en LAURITZEN, 1961). Het blijkt bovendien, dat het glucuronzuur aan het oestriol niet (als ether-glucuronide) aan C₃ gebonden is —, zoals men verwachten zou op grond van hetgeen bij pregnandiolglucuronide het geval is —, maar (als etherglucuronide) waarschijnlijk aan C₁₆ of C₁₇ (zie DICZFALUSY en LAURITZEN, 1961). Anderzijds vonden wij een remming van de p-nitrophenol glucuronidering door oestron, oestradiol en oestriol, terwijl DANCIS, MONEY, CONDON en LEVITZ (1958) bij caviae aantoonde, dat oestriol-C₁₄ en oestradiol-C₁₄ zeer snel van de foetus naar de moeder doorgingen, en wel ongeconjugeerd. Dezelfde onderzoekers vonden, dat geconjugeerde oestrogenen niet of nauwelijks van de foetus naar de moeder doorgingen.

Progesteron (76,5 µg/100 ml. plasma) en derivaten komen in het navelstrengbloed voor (ZANDER, VON MÜNSTERMANN en RUNNEBAUM, 1962). Men

mag niet uitsluiten dat de langzaam op gang komende bilirubine glucuronidering door geslachtssteroïden noncompetitief of nonspecifiek wordt geremd. Behalve deze remmende invloed van de geslachtssteroïden op de gebrekkige glucuronidering van het bilirubine in de eerste levensdagen, is er *nog* een versterkende werking van de geslachtssteroïden op de hyperbilirubinaemie: het is immers niet onaannemelijk, dat de uitscheidingswegen van het bilirubine bij de menselijke pasgeborene, welke in de lever buiten de glucuronidering om kunnen verlopen, worden geremd, zoals wij dit bij de Gunn rat konden bewijzen (Hoofdstuk VIII). In menselijk meconium is bijvoorbeeld ongeconjugeerd oestriol aanwezig (zie DICZFALUSY en LAURITZEN, 1961). Naast de natuurlijke oestrogenen bleken (Hoofdstuk VIII) ook bepaalde kunstmatige geslachtssteroïden na orale toediening de buiten de glucuronidering om verloopende uitscheidingswegen van bilirubine te kunnen blokkeren. Zelfs bepaalde opvulmiddelen hebben deze werking. *Wij achten het daarom verstandig in het algemeen geen geslachtssteroïden toe te dienen aan pasgeborenen met icterus*, i.t.t. het advies van o.a. SCHILLER (1931), SCHREIBER (1933) en DAPSY (1936), die, behalve colostrum en moederlijk serum, oestrogenen toedienden bij icterus neonatorum. Deze therapieën werden gegeven „om de moederlijke geslachtssteroïden, welke de foetus in utero zou hebben gemist (let wel) aan te vullen”.

Behalve voor de vermoedelijk averechtse invloed van de geslachtssteroïden zelf, dient men op zijn hoede te zijn voor de bijwerkingen van de oplosmiddelen van bepaalde parenteraal toegediende geslachtssteroïden (Hoofdstuk VII). Zo diende DE SNOO (zie KLOOSTERMAN, 1947) hoge doses „menformon” toe aan kinderen met icterus neonatorum. Dit „menformon” bevatte, naast oestron, hoogstwaarschijnlijk benzylalcohol, dat, zoals werd bewezen (Hoofdstuk VII) na omzetting in Na-benzoaat bilirubine van de binding aan het serumalbumine kan losmaken. Ondanks mogelijke verlaging van het serumbilirubinegehalte doen deze therapieën meer kwaad dan goed, omdat het bilirubine hierna de weefsels (ook het hersenweefsel) kan ingaan. (Hoofdstuk VII).

Wij zijn Prof. Dr. F. W. Zilliken zeer erkentelijk voor de vele steun en leiding die wij ontvingen bij de experimenten beschreven in Hoofdstuk VIII A, welke op de, onder zijn directie staande, afdeling Biochemie konden geschieden.

SAMENVATTING:

Pasgeborenen hebben in hun lever naast het bekende tekort aan bilirubine glucuronyltransferase, dat aan de geelzucht van de eerste levensdagen ten grondslag ligt (Hoofdstuk I), naar wij konden aantonen, tevens een tekort aan p-nitrophenol glucuronyltransferase (Hoofdstuk II). Dit tekort is van belang voor de steroid stofwisseling van de on- en de pasgeborene, aangezien er (Hoofdstuk V en VIII) goede aanwijzingen zijn dat het p-nitrophenol glucuronyltransferase ook steroiden glucuronideert.

Aangezien er onmiddellijk bij de geboorte geen geelzucht aanwezig is (deze ontstaat pas later), hebben wij de doorgang van het bilirubine door de, met de menselijke placenta verregaand vergelijkbare haemochoriale placenta van de Rhesusaap (*Macacus Mulatta*) onderzocht. Hierbij werd de foetus van de Rhesusaap *in vivo* met bilirubine belast, terwijl de zwangerschap intact bleef. Het bilirubine ging ongeglucuronideerd van de foetus naar de moeder door.

Hoofdstuk III begint met een overzicht van de literatuur over de geelzucht van de Gunn rat. Deze geelzucht is een gevolg van een recessief erfelijk tekort aan bilirubine glucuronyltransferase. De stelling van JOHNSON, SARMIENTO, BLANC en DAY (1959), dat de oorzaak van de neurologische stoornissen van de Gunn rat identiek is met de kernicterus van de pasgeborene, vindt weinig steun in hun onderzoekingen en is in strijd met waarnemingen in onze eigen rattenstam.

Het zeldzame syndroom van CRIGLER-NAJJAR kan op grond van literatuur het syndroom van de Gunn rat bij de mens genoemd worden. (Hoofdstuk IV).

In Hoofdstuk VI beschrijven wij het bestaan van *spontane ovulatoire pubertas praecox bij de homo- en heterozygote Gunn rat*. Vrouwelijke homozygote Gunn ratten zijn eerder geslachtsrijp dan hun heterozygote zusters. Deze vervroegde geslachtsrijping gaat in 60% van de gevallen met ovulaties gepaard. Ook heterozygote Gunn ratten zijn eerder geslachtsrijp dan normale vrouwelijke ratten. De homozygote Gunn ratten kunnen, blijkens literatuur onderzoek, in tegenstelling tot normale ratten, in hun lever, nieren, maag- en duodenumslimvlies en subcorticale hersenweefsel o-aminophenol, 4-methylumbelliferon, o-aminobenzoaat en bilirubine niet glucuronideren. Heterozygote ratten kunnen dit wel, maar in verminderde mate. Ophoping van bilirubine in bepaalde hersenkernen is, blijkens door ons daarop gericht onderzoek, niet de oorzaak van de vervroegde geslachtsrijping. Deze bevindingen wijzen er op, dat eerder een *tekort aan een glucuronyltransferase* (in het subcorticale hersenweefsel?) op enigerlei wijze het hypothalamisch centrum (centra?) ontremt, hetgeen een vervroegde verhoging van de hypofysaire gonadotrope werking veroorzaakt, met het optreden

van ovulatoire pubertas praecox als gevolg.

In Hoofdstuk VII wordt beschreven, hoe wij, naar aanleiding van de vraag, of de Gunn rat wellicht natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden anders metaboliseert dan de normale Wistar rat, stootten op de invloed, die *oplosmiddelen van onderhuids toegediende geslachtssteroïden op het serumbilirubinegehalte van de Gunn rat* kunnen hebben. Benzylalcohol, Na-benzoaat, Na-phenylacetaat, Na-kaneelzuur, Na-anthranilaat en Na-salicylaat veroorzaken na onderhuidse toediening aan Gunn ratten een voorbijgaande daling van het serumbilirubinegehalte. „Davitam K”, „Konakion” en penicillamine-HCl doen dit niet. Uit de verandering van het absorptiespectrum van een albuminebilirubine model bleek, dat het Na-benzoaat en het Na-phenylacetaat het *bilirubine uit de binding met het albumine losmaken*. Op grond van literatuur gegevens moet men aannemen, dat primaire aromatische alcoholen, esters van primaire aromatische alcoholen, phenyl- β -hydroxyzuren, phenyl- β -ketozuren en onvertakte phenylcarbonzuren kunnen worden omgezet in benzoëzuur of phenylazijnzuur, afhankelijk van de lengte van hun zijketen. Als deze stoffen al niet zelf een verdringing van het bilirubine uit de binding aan albumine bewerkstelligen, zullen zij dit waarschijnlijk doen na hun omzetting in benzoëzuur, respectievelijk phenylazijnzuur. Na het losmaken van het bilirubine uit de binding aan het albumine kan het door de vaatwand heen gaan. (Odell, 1959). De beschreven werking van de genoemde oplosmiddelen lijkt consequenties te hebben voor het toedienen van geneesmiddelen aan kinderen met icterus neonatorum.

Een aantal natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden, met name progesteron, pregnandiol, oestron, oestradiol, oestriol, lynestrenol en methylnortestosteron (Hoofdstuk VIII) blijkt, in vitro, de glucuronidering van het p-nitrophenol te remmen. Voor deze onderzoeken hebben wij gebruik gemaakt van een gedeeltelijk gezuiverd glucuronyltransferase. *Pregnandiol blijkt de glucuronidering van het p-nitrophenol competitief te remmen, zodat men mag besluiten, dat waarschijnlijk het glucuronyltransferase van p-nitrophenol met dat van pregnandiol identiek is.*

Aangezien levermicrosomen van volwassen Gunn ratten in vitro p-nitrophenol, anders dan bilirubine, even goed glucuronideren als levermicrosomen van volwassen Wistar ratten (Hoofdstuk VIII), is er geen reden om aan te nemen, dat Gunn ratten op volwassen leeftijd geslachtssteroïden niet op normale wijze glucuronideren. Het is daarom begrijpelijk, dat de voortplanting (met name de fertiliteit) van de eenmaal volwassen geworden vrouwelijke Gunn rat ongestoord lijkt te zijn (Hoofdstuk VI).

In Hoofdstuk VIII worden de onderzoeken vermeld, waaruit blijkt,

dat het moeilijk is aan te nemen, dat het glucuronyltransferase van p-nitrophenol (en dus van pregnandiol?) identiek zou zijn met dat van bilirubine. Onze proeven zijn dus niet in overeenstemming met de waarnemingen van ISSELBACHER, CHABRAS en QUINN (1962), die vonden, dat het p-nitrophenol glucuronyltransferase bilirubine in geringe mate (3%) glucuronideert. Overigens worden onze waarnemingen gesteund, omdat wij hebben kunnen vaststellen, dat levermicrosomen van volwassen Gunn ratten, die het bilirubine glucuronyltransferase volledig missen, p-nitrophenol op geheel normale wijze glucuronideren.

Natuurlijke en kunstmatige geslachtssteroïden, *per os* toegediend in een indifferent opvulmiddel, blijken de leverfunctie van de Gunn rat te beïnvloeden (Hoofdstuk VIII). Kristallijn oestron, oestriol, oestradiol, methylnotestosteron, lynestrenol, norethisteron en ook „Enavid” handelstabletten veroorzaken een verhoging van het serumbilirubinegehalte. Deze verhoging ontstaat niet na *onderhuidse* toediening van progesteron, en ook niet na orale toediening van fysiologisch zout, progesteron, isopregnenon, aethyloestrenol en stilboestrol. Een daling van het serumbilirubinegehalte treedt op na orale toediening van Gestanon (allylestrenol) en Ultandren (fluoxymesteron). Na orale toediening van „Orgasteron” handelstabletten blijkt bij electronenmicroscopisch onderzoek de Gunn rattenlever de volgende afwijkingen te hebben: er zijn ophopingen van vet in de levercellen, er is dilatatie van het endoplasmatisch reticulum. Het uiterlijk van de „pericanalicular dense bodies” is duidelijk veranderd. Merkwaardig is, dat ook de opvulmiddelen van „Orgasteron” handelstabletten een verhoging van het serumbilirubinegehalte blijken te veroorzaken.

Vraagt men zich af, of uit onze vondsten klinische gevolgtrekkingen te maken zijn, dan willen wij er op wijzen, dat de doses, waarmee de steroïden hun invloed op de leverfunctie deden gelden, zeer hoog waren. Ook is het klinische syndroom, dat geheel met dat van de Gunn rat vergelijkbaar is (het syndroom van CRIGLER-NAJJAR) een zeldzaam voorkomende aandoening (Hoofdstuk IV). De menselijke pasgeborene heeft een voorbijgaand tekort aan bilirubine glucuronyltransferase. Dit tekort is verantwoordelijk voor de hyperbilirubinaemie, welke in de eerste levensdagen kan optreden, vooral bij vroeggeborenen. Wanneer men een behandeling met steroïden wil instellen, is het verstandig om voor ogen te houden, dat het mogelijk lijkt de zich ontwikkelende leverfunctie te beïnvloeden.

SUMMARY:

The human neonate is born with a bilirubinglucuronyltransferase deficiency in the liver. This deficiency is responsible for the hyperbilirubinaemia that occurs in the first days of life (Chapter I). We have been able to establish a p-nitrophenylglucuronyltransferase deficiency in human neonates (Chapter II). This deficiency is important for the metabolism of the sex steroids of the fetus and the newborn, as there is evidence that p-nitrophenylglucuronyltransferase is also responsible for the formation of steroidglucuronides (Chapter V and VIII).

As the human neonate is not jaundiced immediately after birth, we have investigated the passage of bilirubin through the haemochorial placenta of the Rhesus monkey (*Macacus Mulatta*). This placenta is almost entirely comparable with the human placenta. In our experiments bilirubin was injected into the circulation of the fetus of the Rhesus monkey, while pregnancy was uninterrupted. Bilirubin passed unconjugated from the fetus to the mother.

In Chapter III the literature concerning the jaundice of the Gunn rat is surveyed. This jaundice is caused by a recessively hereditary bilirubinglucuronyltransferase deficiency. We further discuss the statement, made by JOHNSON, SARMIENTO, BLANC and DAY (1959), that the cause of the neurological disturbances that may occur in Gunn rats is identical with kernicterus in the human neonate. This statement would not seem to be justified in view of their investigations and is not in agreement with observations in our own strain of rats.

In Chapter IV a description is given of the CRIGLER-NAJJAR syndrome. After a survey of literature it is concluded that this clinical condition represents the syndrome of the Gunn rat in man.

In Chapter VI we describe *spontaneous ovulatory precocious puberty in homo- and heterozygous Gunn rats*. Female homozygous Gunn rats reach sexual maturity at an earlier stage than their heterozygous littermates. This precocious puberty was accompanied with ovulations in 60% of cases. Heterozygous female Gunn rats reach sexual maturity earlier than normal female rats. The homozygous Gunn rat, as is reported in literature, has a deficiency of o-aminophenyl-, 4-methylumbelliferone-, o-aminobenzoate-, and bilirubinglucuronyltransferase in its liver, kidneys, gastric and duodenal mucosa and subcortical brain tissue. Heterozygous rats cannot conjugate the above aglucones to the same extent as normal ones. From our own investigations into this matter it appears that accumulation of bilirubin in certain areas of the brain is not the cause of this precocious puberty. These findings are more likely to point to a *glucuronyltransferase deficiency* (in the subcortical brain?) as a possible influence on the hypothalamic inhibiting centre (centres?), which effects an earlier release of hypophysary gonadotropic activity,

resulting in ovulatory precocious puberty.

In Chapter VII we describe how, in the course of an experimental investigation to discover if the Gunn rat metabolises natural and synthesized sex steroids differently from the normal Wistar rat, we were faced with the influence that *solvents of subcutaneously administered sex steroids may have on the serumbilirubinconcentration of the Gunn rat*. After subcutaneous administration to Gunn rats benzylalcohol, Na-benzoate, Na-phenylacetate, Na-cinnamate, Na-anthranilate and Na-salicylate cause a transient decrease in the serumbilirubinconcentration. „Davitamon-K“, „Konaktion“ and penicillamine-HCl do not. From spectrophotometric studies of an albumin bilirubin model it appeared that Na-benzoate and Na-phenylacetate *compete with bilirubin for binding sites on albumin*. From the literature of this subject it may be concluded, that whether or not primary aromatic alcohols, phenyl- β -hydroxy acids, phenyl- β -ketone acids and unbranched phenylalkyl-acids may be metabolised into benzoic acid or phenylacetic acid, depends on the length of their side chains. If these substances themselves do not compete with bilirubin for binding sites on albumin, they are likely to do so after they have been metabolised in to benzoic acid and phenylacetic acid. The free bilirubin molecule disappears from the blood into the tissues (ODELL, 1959). This discovery seems to have consequences as regards the administration of medicaments to icteric newborns.

A number of natural and synthesized sex steroids, notably progesterone, pregnanediol, oestrone, oestradiol, oestriol, lynestrenol and methyltestosterone (Chapter VIII), inhibit p-nitrophenylglucuronide formation in vitro. In these experiments a partially purified glucuronyltransferase was used. Pregnanediol was shown to be a competitive inhibitor of p-nitrophenylglucuronide formation. So we are probably justified in concluding that p-nitrophenylglucuronyltransferase is identical with pregnanediolglucuronyltransferase.

As microsomal preparations of the liver of adult Gunn rats conjugate in vitro p-nitrophenol with glucuronic acid as well as similar preparations of the liver of normal rats do, adult Gunn rats are likely to conjugate the sex steroids in a normal way. From this it becomes clear that the reproduction (notably the fertility) of adult female Gunn rats is normal (Chapter VI).

In Chapter VIII the experiments are described, from which it becomes apparent, that it is hard to believe that p-nitrophenylglucuronyltransferase (and so the glucuronyltransferase of pregnanediol?) is identical with bilirubinglucuronyltransferase. So the results of our experiments were not in agreement with the observations of ISSELBACHER, CHABRAS and QUINN (1962), who found that p-nitrophenylglucuronyltransferase has a slight (3%) activity for bilirubin. Our observations are supported

by the fact that we were able to establish that liver microsomes of adult Gunn rats possess normal p-nitrophenylglucuronyltransferase activity, in the absence of bilirubinglucuronyltransferase.

Natural and synthesized sex steroids turned out to influence the liver function of the Gunn rat after *oral* administration. Crystalline oestrone, oestradiol oestriol, methyltestosterone, lynestrenol, norethisterone and also „Enavid” tablets caused an increase in serumbilirubinconcentration. This increase is not produced after *subcutaneous* administration of progesterone, nor after *oral* administration of physiologic saline solution, progesterone, isopregnenone, aethyloestrenol and stilboestrol. A decrease in serumbilirubinconcentration was observed after oral administration of Gestanon (allylestrenol) and Ultandren (fluoxymesterone). After oral administration of „Orgasteron” tablets electronmicroscopic studies of the Gunn rat liver reveal an accumulation of fat in the liver cells, dilatation of the endoplasmatic reticulum and a change of the „pericanalicular dense bodies”. It is remarkable, that also the so-called „inactive substances” of „Orgasteron” tablets should produce an increase in the serumbilirubinconcentration of Gunn rats.

If it be asked whether our discoveries have clinical consequences, we would like to point out that the doses used to produce the effect on the liver function were very high. Also the clinical condition completely comparable with the situation in the Gunn rat (the CRIGLER-NAJJAR syndrome) is rare (Chapter IV). The human neonate is born with a transient bilirubinglucuronyltransferase deficiency. This deficiency is responsible for the hyperbilirubinaemia that can occur in the first days of life, especially in premature newborns. If treatment with steroids is considered, it seems wise to keep in mind that interference with developing liverfunction is a possibility.

LITERATUUR.

- Akkerén, Y. (1954) Prolonged jaundice in the newborn associated with congenital myxedema. A syndrome of practical importance. *Acta paediat* 43, 411.
- Allison, A. C. (1955) Danger of vitamin K to newborn. *Lancet* I, 669.
- Amoroso, E. C. (1961) Histology of the placenta. *Brit. med. Bull.* 17, 81.
- Arias I. M., I. M. London, (1957) Bilirubin glucuronide formation in vitro; Demonstration of a defect in Gilbert's disease. *Science* 126, 563.
- Arias, I. M. (1959a) Gilbert's disease. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 35, 450.
- Arias, I. M. (1959b) A defect in microsomal function in nonhemolytic acholuric jaundice. *J. Histochem. Cytochem.* 7, 250.
- Arias, I. M., L. Johnson (1959) Studies of bilirubin excretion in normal and Gunn's rats. *J. Clin. Res.* 7, 291.
- Arias, I. M., L. Johnson, S. Wolfson (1960) Studies of extrahepatic glucuronide formation in normal and Gunn's rats. *J. Clin. Res.* 8, 28.
- Arias, I. M., S. Goldfischer, A. B. Novikoff, E. Essner (1961) The effect of 17-ethyl-19-nortestosterone and icterogenin on the hepatic metabolism of bilirubin in normal and Gunn rats. *J. Clin. Invest.* 40, 1023.
- Arias, I. M. (1961) Ethereal and N-linked glucuronide formation by normal and Gunn rats in vitro and in vivo. *Bioch. Bioph. R. Comm.* 6, 81.
- Arias, I. M. (1962) in „Ciba Symposium on Protein Metabolism in Health and Disease“, held in Noordwijk-Holland. Berlin.
- Artz, N., E. Osman (1950) Biochemistry of glucuronic acid. New York.
- Axelrod, J., J. K. Inscoc, G. M. Tomkins (1958) Enzymatic synthesis of N-glucosyluronic acid conjugates. *J. Biol. Chem.* 232, 835.
- Becker, P. F. L., P. Vogel (1948) Kernicterus. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 7, 190.
- Bernstein, J., A. Brown (1960) Sepsis and jaundice in infancy. *Amer. J. Dis. Child.* 100, 569.
- Biemond, A. (1950) Diagnostiek van hersenziekten. Haarlem.
- Billing, B. H. (1954) The quantit. determination of bile pigments in serum using reverse phase partition chromatography. *Biochem. J.* 56, XXX.
- Billing, B. H. (1955a) The three serum bile pigments in obstr. jaundice and hepatitis. *J. Clin. Path.* 8, 128.
- Billing, B. H. (1955b) Serum bile pigments in obstructive jaundice and hepatitis. *J. Clin. Path.* 8, 130.
- Billing, B. H., G. H. Lathe (1956) The excretion of bilirubin as an ester glucuronide giving the direct van den Bergh reaction. *Biochem. J.* 63, 6 P.
- Billing, B. H., G. H. Lathe (1957) The excretion of bilirubin as a diglucuronide giving the direct van den Bergh reaction. *Biochem. J.* 65, 774.
- Billing, B. H., G. H. Lathe (1958) Bilirubin metabolism in jaundice. *Amer. J. Med.* 24, 111.
- Biskind, G. R., J. Mark (1939) The inactivation of testosterone propionate and estrone in rats. *Bull. John Hopkins hosp.*, 65, 212.
- Blanc, W. A., L. Johnson (1959) Studies on kernicterus. Relationship with sulfonamide intoxication; Report on kernicterus in rats with glucuronyltransferase deficiency. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 18, 165.
- Blanc, W. A. (1961) in „Kernicterus“ international Congress of Paediatrics, Montreal, July 1959. Toronto.
- Bollet, A. J., J. E. Goodwin, A. K. Brown (1959) Metabolism of mucopolysaccharides in connective tissue. *J. Clin. Invest.* 38, 251.
- Bollman, J. L. (1959) in Panel: Bilirubin Metabolism, H. R. Butt, Moderator, *Gastroenterology*, 36, 161.

- Boyd, W. (1954) A textbook of pathology, London, 6e ed., 782.
- Brown, A. K., W. W. Zuelzer, H. H. Burnett (1958) Studies in the neonatal development of the glucuronide conjugating system. *J. Clin. Invest.* 37, 332.
- Bruton, O., W. Crosby, A. Motulsky (1954) Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia presenting as hemolytic disease of the newborn infant. *Pediatrics* 13, 41.
- Burnstine, R. C., R. Schmid (1962) Solubility of bilirubin in aqueous solutions. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 109, 356.
- Byers, R. K., R. S. Paine, B. Crothers (1955) Extrapyramidal cerebral palsy with hearing loss following erythroblastosis. *Pediatrics* 15, 248.
- Carbone, J. V., G. M. Grodsky (1957) Constitutional nonhemolytic hyperbilirubinaemia in the rat: defect of bilirubin conjugation. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 94, 461.
- Childs, B., V. A. Najjar (1956) Familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. A report of two cases without neurologic damage. *Pediatrics* 18, 369.
- Claireaux, A. E. (1950) Haemolytic disease of the newborn. *Arch. Dis. Childh.* 25, 61.
- Claireaux, A. E. (1961) in „Kernicterus“ international Congress of Paediatrics, Montreal, July 1959. Toronto.
- Cock, T. C. (1957) Acute hemolytic anemia in the neonatal period. *Amer. J. Dis. Child.* 94, 77.
- Cole, P. G., G. H. Lathe (1953) The separation of serum pigments giving the direct and indirect van den Bergh reaction. *J. Clin. Path.* 6, 99.
- Cole, P. G., G. H. Lathe, B. H. Billing (1954) Separation of the bile pigments of serum, bile and urine. *Biochem. J.* 57, 514.
- Conrad, E., R. Schmidt (1946) Congenital hemolytic anemia. A case requiring early splenectomy. *Amer. J. Dis. Child.* 72, 731.
- Crigler, J. F., V. A. Najjar (1952) Congenital familial nonhemolytic jaundice. *Pediatrics* 10, 169.
- Crosse, V. M., T. C. Meyer, J. W. Gerrard (1955) Kernicterus and prematurity, *Arch. Dis. Childh.* 30, 501.
- Cunningham, A. A. (1956) Resorcin poisoning. *Arch. Dis. Childh.* 31, 173.
- Day, R., L. Johnson (1959) Kernicterus. *Progr. Hemat.* 11, 133.
- Diczfalusy, J. E., Ch. Lauritzen (1961) Oestrogene beim Menschen, Berlin.
- Diczfalusy, E. (1962) Endocrinology of the foetus. *Acta obst. et gynaec. scand.*, XLI, suppl. 1, 45.
- Dixon, W. J., A. M. Mood (1946) The statistical sign test. *J. Amer. Stat. Ass.* 41, 556.
- Donovan, B. T., J. J. van der Werff ten Bosch (1956) Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions. *Nature*, 178, 745.
- Dowben, R. M., D. Y. Hsia (1962) Inhibition of glucuronyltransferase by steroids. *J. Lab. Clin. Med.* 60, 870.
- Doxiades, S. A., Ph. Fessas, T. Valaes (1961) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. A new aetiological factor of severe neonatal jaundice. *Lancet* I, 297.
- Dutton, G. J., I. D. E. Storey (1951) Glucuronide synthesis in liver homogenates. *Biochem. J.* 48, XXIX.
- Dutton, G. J., I. D. E. Storey (1953) The isolation of a compound of uridine diphosphate and glucuronic acid from liver. *Biochem. J.* 53, XXXVII.
- Dutton, G. J., I. D. E. Storey (1954) Uridine compounds in glucuronic acid metabolism. *Biochem. J.* 57, 275.
- Dutton, G. J. (1955) Uridine-diphosphate-glucuronic acid and ester glucuronide synthesis. *Biochem. J.* 60, XIX.
- Dutton, G. J. (1956) Uridine diphosphate glucuronic acid as glucuronyl donor in the synthesis of „ester“, aliphatic and steroid glucuronides. *Biochem. J.* 64, 693.
- Dutton, G. J., C. G. Greig (1957) Observations on the distribution of glucuronide synthesis in tissues. *Biochem. J.* 66, 52P.

- Dutton, G. J. (1958) Foetal and gastro-intestinal glucuronide synthesis. *Biochem. J.* 69, 39P.
- Dutton, G. J., J. P. Montgomery (1958) Glucuronide synthesis in fish and the influence of temperature. *Biochem. J.* 70, 17P.
- Dutton, G. J., J. H. Stevenson (1959) Synthesis of glucuronides and of uridine diphosphate glucuronic acid in kidney cortex and gastric mucosa. *Biochim. biophys. Acta* 31, 568.
- Feingold, D. S., E. F. Neufeld, W. Z. Hassid (1958) Enzymic synthesis of uridine diphosphate glucuronic acid and uridine diphosphate galacturonic acid with extracts from *Phaseolus aureus* seedlings. *Arch. Biochem.* 78, 401.
- Findlay, L., G. Higgins, M. W. Stanier (1947) Icterus neonatorum: its incidence and cause. *Arch. Dis. Childh.* 22, 65.
- Finkelstein, H. (1938) Säuglingskrankheiten, Amsterdam, 747.
- Fisch, L., A. P. Norman (1961) Hyperbilirubinaemia and perceptive deafness. *Brit. med. J.* 5245, 142.
- Fischer, H., H. W. Haberland (1935) Über die Konstitution des Bilirubins sowie die seiner Azofarbstoffe und die Gmelinsche Reaktion. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 232, 236.
- Ginsburg, V. (1958) Purification of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from Mung bean seedlings. *J. Biol. Chem.* 232, 55.
- Glass, S. J., H. A. Edmondson, S. N. Soll (1940) Sex hormone changes associated with liver disease. *Endocrinology*, 27, 749.
- Goldbloom, A., R. Gottlieb (1929) Icterus neonatorum, *Amer. J. Dis. Childh.* 38, 57.
- Golden, J. B., E. L. Sevringhaus (1938) Inactivation of estrogenic hormone of the ovary by the liver. *Proc. soc. exp. biol. med.* 39, 361.
- Grodsky, G. M., J. V. Carbone (1957) Enzymatic defect in constitutional nonhemolytic hyperbilirubinemia (CNH) in the rat. *Fed. Proc.* 16, 189.
- Grodsky, G. M., J. V. Carbone (1957) The synthesis of bilirubin glucuronide by tissue homogenates. *J. Biol. Chem.* 226, 449.
- Grodsky, G. M., J. V. Carbone, R. Franska (1958) Enzymatic defect in metabolism of bilirubin in fetal and newborn rat. *Proc. Soc. exp. Biol.* 97, 291.
- Gunn, C. K. (1938) Hereditary acholuric jaundice. *J. Hered.* 29, 137.
- Gunn, C. K. (1944) Hereditary acholuric jaundice in the rat. *Canad. Med. Ass. J.* 50, 230.
- Halbrecht, I. (1944) Role of hemoagglutinins anti-A and anti-B in pathogenesis of jaundice of the newborn (icterus neonatorum praecox) *Amer. J. Dis. Child.* 68, 248.
- Hargreaves, T., J. B. Holton (1962) Jaundice of the newborn due to novobiocin. *Lancet* I, 839.
- Hartiala, K. J. V., M. Pulkkinen (1955) Studies on detoxication mechanisms. Glucuronide synthesis in foetal rabbit. *Ann. Med. exp. Fenn.* 33, 246.
- Hartiala, K. J. V., A. Lehtinen (1959). Duodenal glucuronide synthesis. *Acta chem. scand.* 13, 839.
- Hsia, D. Y., F. H. Allen, L. K. Diamond, S. S. Gellis (1953) Serum bilirubin levels in the newborn infant. *J. Pediat.* 42, 277.
- Hsia, D. Y., R. M. Dowben, R. Shaw, A. Grossman (1960) Inhibition of glucuronosyl transferase by progestational agents from serum of pregnant women. *Nature*, 187, 693.
- Hijmans van den Bergh, A. P. Muller (1916) Über eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin. *Biochem. Zeitschr.* 77, 90.
- Isselbacher, K. J. (1958) The demonstration of bilirubin sulfate in bile. *J. clin. Invest.* 37, 904.

- Isselbacher, K. J., E. A. Mc. Carthy (1959) Studies on bilirubin sulfate. *J. clin. Invest.* 38, 645.
- Isselbacher, K. J. (1961) Solubilization and purification of glucuronyltransferase. *Bioch. Bioph. R. Comm.* 5, 243.
- Isselbacher, K. J., M. F. Chabras, R. C. Quinn (1962) The solubilization and partial purification of a glucuronyl transferase from rabbit liver microsomes. *J. biol. Chem.* 237, 3033.
- Jablonski, W. J. (1962) Risks associated with exchange transfusion. *New. Engl. J. Med.* 266, 155.
- Jervis, G. A. (1959) Constitutional nonhemolytic hyperbilirubinemia with findings resembling kernicterus. *Arch. Neurol and Ps. Chic.* 81, 55.
- Jirsa, M., B. Vecerek, M. Ledvina (1956) Di- and mono-taurobilirubin similar to a directly reacting form of bilirubin in serum. *Nature* 177, 895.
- Johnson, L., F. Sarmiento, R. Day (1958) Studies of kernicterus in genetically jaundiced rats. *Amer. J. Dis. Child.* 96, 504.
- Johnson, L., F. Sarmiento, W. A. Blanc, R. Day (1959). Kernicterus in rats with an inherited deficiency of glucuronyltransferase. *Amer. J. dis. Child.* 97, 591.
- Johnson, L., E. Figueroa, M. L. Garcia, H. Newmark (1959) The effect of certain substances on bilirubin levels and occurrence of kernicterus in jaundiced rats. *Amer. J. dis. Child.* 98, 602.
- Johnson, L., M. L. Garcia, E. Figueroa, F. Sarmiento (1961) Kernicterus in rats lacking glucuronyl transferase. *Amer. J. dis. Child.* 101, 322.
- Kalckar, H., E. Anderson, K. Isselbacher (1956) Galactosemia, a congenital defect in a nucleotide transferase. *Biochim. biophys. Acta* 20, 262.
- Kalckar, H. M., E. S. Maxwell (1958) Biosynthesis and metabolic function of uridine diphosphoglucose in mammalian organisms and its relevance to certain inborn errors. *Physiol. Rev.* 38, 77.
- Kaplan, E. (1959) Studies of red cell survival in early infancy. *Amer. J. dis. Child.* 98, 603.
- Kaplan, E. (1961) in „Kernicterus“ international Congress of Paediatrics, Montreal, July 1959. Toronto.
- Karunairatnam, M. C., L. M. H. Kerr, G. A. Levy (1949) The glucuronide-synthesizing system in the mouse and its relationship to β -glucuronidase. *Biochem. J.* 45, 496.
- Van Kessel, H. I. A. M., F. Zonderland (1961) Bilirubineconcentratie bij icterus neonatorum. *Ned. T. Verlosk.* 61, 298.
- Kirgis, H., I. Rothchild (1952) In vivo inactivation of estradiol by human liver. *Endocrinology*, 50, 269.
- Kloosterman, G. J. (1947) Over de polyletaliteit in verband met het vlokkenstroma en de rhesusfactor. Diss. Utrecht.
- Lathe, G. H., M. Walker (1957) An enzyme defect in human neonatal jaundice and in Gunn's strain of jaundiced rats. *Biochem. J.* 67, 9P.
- Lathe, G. H., C. R. J. Ruthven (1958) Factors affecting the rate of coupling of bilirubin and conjugated bilirubin in the van den Bergh reaction. *J. clin. Path.* 11, 155.
- Lathe, G. H., M. Walker (1958a) The synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver. *Biochem. J.* 70, 705.
- Lathe, G. H., M. Walker (1958b) Inhibition of bilirubin conjugation in rat liver slices by human pregnancy and neonatal serum and steroids. *Quart. J. Exp. Physiol.* 43, 257.
- Lester, R., L. Hammaker, R. Schmid (1962) A new therapeutic approach to unconjugated hyperbilirubinaemia. *Lancet II*, 1257.

- van Leusden, H. A. I. M., J. A. J. M. Bakkeren, F. Zilliken, L. A. M. Stolte (1962) p-Nitrophenylglucuronide formation by homozygous adult Gunn rats. *Bioch. Bioph. R. Comm.* 7, 67.
- van Leusden, H. A. I. M. in „Symposium on Gestagens”, held by the Dept. of obst. and gynaec., Univ. of Gent, Belgium, 20 okt. 1962, wordt gepubliceerd in Bull. Soc. Roy. Belge.
- Levine, P., E. Katzin, L. Burnham (1941) Iso-immunisation in pregnancy. *J. Amer. med. Ass.* 116, 825.
- Levy, G. A., I. D. E. Storey (1949) The measurement of glucuronide synthesis by tissue preparations. *Biochem. J.* 44, 295.
- Li, M. H., W. U. Gardner (1949) Further studies on pathogenesis of ovarian tumors in mice. *Cancer Research*, 9, 35.
- Lineweaver, H., D. Burk (1934) Determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. chem. Soc.* 56, 658.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Luce-Clausen, E. M., E. F. Brown (1939) The use of isolated radiation in experiments with the rat. *J. Nutr.* 18, 551.
- Lucey, J. F. (1960) Hyperbilirubinemia of prematurity. *Pediatrics*, 25, 690.
- Mc. Cance (1960) in „The Placenta and fetal membranes”, Cl. A. Villee, ed. New York. p. 197 e.v.
- Malloy, H. T., K. A. Evelyn (1937) The determination of bilirubin with the photo-electric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119, 481.
- Malloy, H. T., L. Lowenstein (1940) Hereditary jaundice in the rat. *Canad. med. Ass. J.* 42, 122.
- Martin, N. H. (1949) Preparation and properties of serum and plasma proteins XXI interactions with bilirubin. *J. Amer. chem. Soc.* 71, 1230.
- Maxwell, E. S., H. M. Kalchar, J. L. Strominger (1956) Some properties of uridine diphosphoglucose dehydrogenase. *Arch. Biochem.* 65, 2.
- Michaëlsson, M. (1961) Bilirubin determination in serum and urine, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 13, Suppl. 56.
- Mills, G. T., A. C. Lochhead, E. E. B. Smith (1958) Uridine pyrophosphoglycosyl compounds and the formation of glucuronides by isolated enzyme systems. *Biochim. biophys. Acta* 27, 110.
- Mollison, H. P. L., (1948) Physiological jaundice of the newborn. *Lancet* I, 513.
- Mollison, H. P. L., M. Cutbush (1951) A method of measuring the severity of a series of cases of haemolytic disease of the newborn. *Blood*, 6, 777.
- Moore, T., J. M. Sharman (1955) Danger of vitamin-K analogues to newborn. *Lancet* I, 819.
- Mores, A., I. Fargasova, E. Mineraiikova (1959) The relation of hyperbilirubinemia in newborns without isoimmunisation to kernicterus. *Acta paediat. (Uppsala)* 68, 590.
- Motulsky, A. G. (1961) Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, haemolytic disease of the newborn and malaria. *Lancet* I, 1168.
- Mühlbock, O. (1953) Ovarian tumours in mice in parabiotic union. *Acta Endocrinologica*, 12, 105.
- Munch-Petersen, A. (1955) Investigations of the properties and mechanism of the uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase reaction. *Acta chem. scand.* 9, 1523.
- Neufeld, E. F., D. S. Feingold, W. Z. Hassid (1959) Enzymic phosphorylation of D-glucuronic acid by extracts from seedlings of *Phaseolus aureus*. *Arch. Biochem.* 83, 96.
- Odell, G. B. (1959) Protein binding of bilirubin and its possible relationship to kernicterus. *Amer. J. dis. Child.* 98, 624.

- Odell, G. B. (1959) The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications. *J. Pediat.* 55, 268.
- Odell, G. B. (1959) Studies in kernicterus. The protein binding of bilirubin. *J. Clin. Invest.* 38, 823.
- Orth, J. (1875) Ueber das Vorkommen von Bilirubinkrystallen bei neugeborenen Kindern. *Virchows Arch. path. Anat.* 63, 447.
- Overbeek, J. Th. G., C. L. J. Vink, H. Deenstra (1955) The solubility of bilirubin. *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, 74, 81.
- Overbeek, J. Th. G., C. L. J. Vink, H. Deenstra (1955) Kinetics of the formation of azobilirubin. *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 74, 85.
- Page, E. (1960) in: The placenta and fetal membranes. ed. Cl. A. Villee, New York, 197.
- Palmer, H. D., C. W. Requiem (1957) Management of hemolytic disease of the newborn. *Postgrad. Med.* 22, 469.
- Peterson, R. E., R. Schmid (1957) A clinical syndrome associated with a defect in steroid glucuronide formation. *J. clin. Endocr.* 17, 1485.
- Renaer, M. J. (1945) Het ijzermetabolisme bij moeder en kind. Diss. Leuven.
- Reynolds, S. R. M., W. M. Paul, A. S. Huggett (1954) Physiological study of the monkey fetus in utero: a procedure for blood pressure recording, blood sampling, and injection of the fetus under normal conditions. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 59, 1954.
- Rosenthal, I. M., H. J. Zimmerman, N. Hardy (1956) Congenital nonhemolytic jaundice with disease of the central nervous system. *Pediatrics* 18, 378.
- Sabin, A. (1942) Toxoplasmosis. *Advanc. Pediat.* 1, 1.
- Sakamoto, T. (1956) Studies on bile pigments. *Acta Med. Okayama*, 10, 30.
- Schachter, D., D. J. Kass, Th. J. Lammon (1958) Biosynthesis of salicyl glucuronides in vitro. *Fed. Proc.* 17, 304.
- Schachter, D., D. J. Kass, Th. J. Lammon (1959) The biosynthesis of salicyl glucuronides by tissue slices of various organs. *J. Biol. chem.* 234, 201.
- Schalm, L., A. Ph. Weber (1962) De bilirubinepigmenten in bloed en gal na belasting met bilirubine bij de mens. *Ned. T. Geneesk.* 106, 1079.
- Schellekens, L. A., J. C. Seelen, J. H. J. Bakker (1958) Moeilijkheden bij de diagnose „erythroblastosis foetalis door ABO-antagonisme“. *Ned. T. Geneesk.* 102, 1954.
- Schmid, R. (1956) Direct-reacting bilirubin, bilirubin glucuronide, in serum, bile and urine. *Science*, 124, 76.
- Schmid, R. (1957) The identification of „direct reacting“ bilirubin as bil. glucuronide. *J. Biol. Chem.* 229, 881.
- Schmid, R., J. Axelrod, L. Hammaker, I. Rosenthal (1957) Congenital defects in bilirubin metabolism. *J. clin. Invest.* XXXVI, 927.
- Schmid, R., L. Hammaker, J. Axelrod (1957) The enzymatic formation of bilirubin glucuronide. *Arch. Biochem.* 70, 285.
- Schmid, R., J. Axelrod, L. Hammaker, R. L. Swarm (1958) Congenital jaundice in rats, due to a defect in glucuronide formation. *J. clin. Invest.* 37, 1123.
- Schmid, R. (1959) Jaundice and bilirubin metabolism. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 35, 755.
- Schmid, R., S. Buckingham, G. A. Mendenilla, L. Hammaker (1959a) Bilirubin metabolism in the foetus. *Nature* 183, 1823.
- Schmid, R., S. Buckingham, L. Hammaker, S. Mendenilla (1959b) Bilirubin metabolism in the foetus. *Amer. J. dis. Child.* 98, 631.
- Schmid, R., L. Hammaker (1959) Glucuronide formation in patients with constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease) *New. Engl. J. Med.* 260, 1310.
- Schmid, R. (1960) in: The Metabolic Basis of Inherited Disease, ed. J. B. Stanbury, J. B. Wijngaarden, D. S. Frederickson, New York, 226, e.v.
- Schmiedeberg, O. (1881) Ueber Oxydationen und Synthesen ins Thierkörper. *Schmiedeberg's Arch. f. Exp. Path.* 14, 288.

- Schmorl (1904) Zur Kenntniss des Ikterus Neonatorum, insbesondere der dabei auftretenden Gehirnveränderungen. *Verhandlungen d. Deutsch. pathol. Gesellschaft.* 15, 109.
- Seelen, J. C. (1955) Het bloedgroepensysteem ABO en de normale zwangerschap, in verband met het probleem van de erythroblastosis foetalis. Diss. Utrecht.
- Seelen, J. C. Enkele beschouwingen over het ontstaan van icterus neonatorum. *Ned. T. Geneesk.* 100, 2193.
- Seelen, J. C. (1957) Het ABO-antagonisme. *Ned. T. Geneesk.* 101, 1176.
- Seelen, J. C. (1961) Transabdominale amnionpunctie-bilirubinegehalte van het vruchtwater. *Ned. T. Verlosk.* 61, 337.
- Sidbury, J. E. (1961) in Kernicterus, international Congress of Paediatrics. Montreal, July 1959. Toronto.
- Smith, E. E. B., G. T. Mills (1954) Uridine nucleotide compounds of liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 13, 386.
- Smith, E. E. B., G. T. Mills, H. P. Bernheimer, R. Austrian (1958) The formation of uridine pyrophosphoglucuronic acid from uridine pyrophosphoglucose by extracts of a noncapsulated strain of pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 211.
- Smith, C. A. (1959) The Physiology of the Newborn Infant. Oxford.
- Snapper, J., A. Grünbaum, S. Sturkop (1924) Über die Spaltung und die Oxydation von Benzylalkohol und Benzylestern im menschlichen Organismus. *Biochem. Z.* 155, 82.
- Solms, J., D. Feingold, W. Z. Hassid (1957) Uridine-diphosphate N-acetylglucosamine and uridine diphosphate glucuronic acid in Mung bean seedlings. *J. Amer. chem. Soc.* 79, 2342.
- Solvonuk, P. F., L. B. Jaques, J. E. Leddy, L. W. Trevooy, J. W. Th. Spinks (1952) Experiments with C¹⁴ menadione (vitamin K₃). *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 79, 597.
- Soskin, S. (1950) Progress in clinical endocrinology. New York.
- Stevenson, I. H., G. J. Dutton (1962) Glucuronide synthesis in kidney and gastrointestinal tract. *Biochem. J.* 82, 330.
- Stokes, J., I. Wolman, M. Blanchard, J. Farquhar (1951) Viral hepatitis in the newborn: clinical features, epidemiology and pathology. *Amer. J. Dis. Child.* 82, 213.
- Storey, I. D. E., G. J. Dutton (1955) Uridine diphosphate glucuronic acid. *Proc. of the Third Internat. Congr. of Biochemistry.* p. 162.
- Strominger, J. L., H. M. Kalchar, J. Axelrod, E. S. Maxwell (1954) Enzymatic oxydation of uridine diphosphate glucose to uridine diphosphate glucuronic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 6411.
- Strominger, J. L., L. W. Mapson (1957) Uridine diphosphoglucose dehydrogenase of pea seedlings. *Biochem. J.* 66, 567.
- Strominger, J. L., E. S. Maxwell, J. Axelrod, H. M. Kalchar (1957) Enzymatic formation of uridine diphosphoglucuronic acid. *J. Biol. chem.* 224, 79.
- Swingle, W. W., P. Seay, J. Perlmutter, E. J. Collins, E. J. Fredor, G. Barlow (1951) Effect of electrical stimulation of uterine cervix upon sexual development of prepuberal rats. *Amer. J. Physiol.* 167, 599.
- Szabó, L., Z. Kovács, P. Ebrey (1962) Congenital, non-haemolytic jaundice. *Lancet I*, 322.
- Talafant, E. (1956) Properties and composition of the bile pigments giving a direct diazo reaction. *Nature*, 178, 312.
- Talafant, E. (1957) Sodium salt of the directly reacting bile pigment. *Nature*, 180, 1050.
- Talafant, E. (1957) The nature of direct and indirect bilirubin. *Collection Czech. chemical communications* 22, 661.

- Talafant, E., J. Továrek (1959) Factors affecting the rate of bilirubin conjugation in vitro. *Nature* 183, 111.
- Talbot, N. B. (1939) Inactivation of endogenous estrogen by liver. *Endocrinology*, 25, 601.
- Tjon Sien Kie, A. P. J. S. (1961) Icterus neonatorum simplex. Diss. Amsterdam.
- Troen, P., E. E. Gordon (1958) Perfusion studies of the human placenta. *J. clin. Invest.* 37, 1516.
- Turner, D. H., J. F. Turner (1958) Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase of pea seeds. *Biochem. J.* 69, 448.
- Vogel, F. S. (1953) Studies on the pathogenesis of kernicterus. *J. Exp. Med.* 98, 509.
- Waters, W. J., D. A. Richert, H. H. Rawson (1954) Bilirubin encephalopathy. *Pediatrics* 13, 319.
- Waters, W. J., R. Dunham, W. R. Bowen (1958) Inhibition of bilirubin conjugation in vitro. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 99, 175.
- Weber, A. Ph., L. Schalm, J. Witmans (1963) Bilirubin monoglucuronide (Pigment I): a complex. *Acta med. scand.* 173, 19.
- van der Werff ten Bosch, J. J. (1959) Normale en abnormale geslachtsrijping. Diss. Leiden.
- Westman, A. (1946) Inactivation of oestrogens by human liver. *Gynaecologia*, 122, 220.
- Williams, R. T. (1949) Detoxication mechanisms. 2nd ed. London.
- Wyatt, J., L. Saxton, R. Lee, H. Pinkerton (1950) Generalized cytomegalic inclusion disease. *J. Pediat.* 36, 271.
- Zander, J., A. von Münstermann, B. Runnebaum (1962) Steroide im Plasma von menschlichem Plazentablut (Nabelschnurplasma). *Acta Endocrinologica*, 41, 507.
- Zimmerman, H. M., H. Yannet (1933) Kernicterus. Jaundice of the nuclear masses of the brain. *Amer. J. dis. Child.* 45, 740.
- Zuelzer, W. W., A. K. Brown (1961) Neonatal jaundice. *Amer. J. dis. Child.* 101, 87.
- Zuelzer, W. W., L. E. Reisman, A. K. Brown (1961) Studies in hyperbilirubinemia. *Amer. J. dis. Child.* 102, 815.

De figuren en de omslag werden bewerkt door de afdeling medische Illustratie (Hoofd Chr. van Huyzen) in de afdeling medische Fotografie (Hoofd R. Reynen).

STELLINGEN

I

Het glucuronyltransferase van p-nitrophenol is identiek met dat van pregnandiol en niet met dat van oestriol.

Lit.: *dit proefschrift.*

II

De zogenaamde haemo-endotheliale placenta bestaat niet.

Lit.: *Amoroso, E. C. (1961) Histology of the placenta. Brit. Med. Bull. 17, 81.*

III

De aanwezigheid van een intrauteriene soufflé synchroon met de foetale hartslag hoeft niet te duiden op een congenitale hartafwijking.

Lit.: *Eskes, T. K. A. B. (1961) Afwijkingen in de harttonen van de ongeborene. Ned. T. Geneesk. 105, 1365.*

IV

Een abnormale lengte van het Y-chromosoom heeft zeer waarschijnlijk pathologische betekenis.

Lit.: *Van Wijck, J. A. M. (1992) Chromosomaal onderzoek bij de mens. Diss. Nijmegen.*

V

Het beginsel van de *tantalus-beker* kan worden toegepast bij getijdrainage van de blaas.

Lit.: *Ganot, A. (1866) Leerboek der proefondervindelijke en toegepaste natuurkunde, 2e druk, Gouda.*

VI

De reactie op alkalische phosphatase in de granulocyten heeft obstetrische betekenis.

Lit.: *Climie, A. R. W., W. L. Heinrichs, I. J. Foster (1962) Neutrophilic alkaline phosphatase test. Amer. J. Clin. Path. 38, 95.*

VII

De morphologische leververanderingen bij lupus erythematoses hebben niet die aandacht verkregen die zij verdienen.

Lit.: *Jones, W. A., B. Castleman (1962) Liver disease in young women with hyperglobulinemia. Amer. J. Path., XL, 315.*

VIII

De paradoxale bevinding dat pilocarpine spasmolytisch werkt kan volledig worden verklaard uit de intermediaire intrinsieke activiteit van pilocarpine als parasympathicomimeticum.

Lit.: Džoljić, M., D. Atanacković (1962) Action spasmolytique de la pilocarpine. *Arch. int. Pharmacodyn.* CXL, 29.

IX

De scheiding tussen behandeling en controle mag niet zo ver worden gevoerd dat de patiënt er ernstig nadeel van kan ondervinden.

Lit.: Medische ethiek en gedragsleer, 3e druk. Uitgave: Kon. Ned. Mij. tot bevordering der Geneeskunst.

Mertens, A. (1962) Praeventieve en curatieve gezondheidszorg. *Katholieke Gezondheidszorg* 31, 322.

X

Verandering in de microflora van de darm bij kinderen leidt niet obligaats tot diarrhee.

Lit.: Van Ginkel, J. H., A. J. M. Daniëls, L. Hemmes, F. Dekking (1962) Het verband tussen zomerdiarrhee en het bacteriologisch faecesonderzoek. *Voordracht voor het zevende congres van het Nederlands Huisartsen Genootschap op 24-11-1962 te Utrecht. Wordt gepubliceerd in „Huisarts en Wetenschap“.*

XI

De prednisolonphosphaat-test zou van betekenis kunnen zijn voor de differentiële diagnostiek van nieraandoeningen tijdens de zwangerschap.

Lit.: Katz, Y. J., A. Velasquez, S. R. Bourdo (1962) The prednisolone provocative test for pyelonephritis. *Lancet* I, 1144.

XII

Het nut van niet op indicatie geschiedend onderzoek naar lues bij zwangeren dient nader te worden gezien.

XIII

Een systematisch onderzoek naar de audiogrammen van kinderen die ernstige icterus neonatorum hebben doorgemaakt is aangewezen.

XIV

Het is mogelijk en daarom aangewezen tot de operatieve therapie van pancreas annulaire van de pasgeborene te komen zonder Röntgenonderzoek.

XV

Het tijdens de zwangerschap toegenomen neuraminezuurgehalte van het cervixslijm kan de grondslag zijn van een zeer eenvoudige zwangerschapsreactie.

Lit.: Gibbons, R. A. (1959) Chemical properties of two mucoids from bovine cervical mucin. *Bioch. J.* 73, 209.

XVI

Onderzoekingen over eiwittransport van zwangere ratten naar de foetus zijn niet zonder meer voor veralgemening vatbaar.

Lit.: *Mayersbach, H. (1958) Zur Frage des Proteinüberganges von der Mutter zum Foeten. Ztschr.f.Zellforschung 48, 479.*

Mayersbach, H. (1959) Stofftransport von der Mutter zum Fetus (Ratte). Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft auf der 56. Versammlung in Zürich.

XVII

De aandoening beschreven als Morbus Scheuermann is slechts een aan de leeftijd gebonden syndroom, deel uitmakend van een veel fundamenteeler pathologisch gebeuren.

XVIII

De door François en De Rouck gemeten elektrische verschijnselen van het geënucléeerde menselijk oog zijn waarschijnlijk artefacten.

Lit.: *François, J., A. de Rouck (1962) Etude électro-rétinographique de l'oeil humain énuclée. Ophthalmologica 144, 126.*

Bernards, J. A., G. P. M. Horsten, J. E. Winkelman (1962) Can the enucleated vertebrate eye give an electrical response to illumination? Arch. Int. de Physiologie et de Biochimie 70, 356.

XIX

Voor de beoordeling van het zogenaamde Luikse softenonproces is het onderscheid tussen subjectieve en objectieve moraliteit van wezenlijk belang.

Lit.: *De Brie, G. A. (1962) Euthanasie. De Maand, 5, 612.*

